



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Regulación de la expresión génica de GDNF humano en neuronas dopaminérgicas
nigrales usando un nuevo sistema de nanopartícula NTS-poliplex regulado por
doxiciclina”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. ARMANDO DE JESÚS ESPADAS ÁLVAREZ

Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la Tesis:
Dr. Daniel Martínez Fong

El presente trabajo de investigación se realizó en el departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la tutoría del **Dr. Daniel Martínez Fong**. Se contó con la asesoría de la **Dra. María del Refugio García Villegas**, del **Dr. Jorge Aceves Ruíz**, profesores investigadores titulares del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV. Además se contó con la asesoría de la **Dra. América Alejandra Padilla Viveros**; investigadora 2C, de la Coordinación de Programas de Posgrado Multidisciplinario (CINVESTAV-IPN) y del **Dr. Juan Antonio González Barrios**; Profesor-Investigador. Jefe del Laboratorio de Medicina Genómica, Hospital Regional, 1ro de octubre (ISSSTE).

Dedicatorias

Quiero dar gracias a Dios, por haberme permitido concluir una meta más en mi vida.

A mis padres, Nidia y Armando, por haberme dado la vida y guiado para que fuera lo que soy ahora.

A mis hermanas, Gabriela y Yuliana, por el apoyo y el cariño que siempre me han dado.

A mis tíos Emma y Adolfo, por haberme apoyado en todo momento.

A mi esposa y a mi hijo, por hacerme inmensamente feliz.

Agradecimientos

No cabe duda, que el logro de esta meta sólo fue posible con la participación de todos.

Gracias al CONACYT, por otorgarme la beca para realizar mis estudios de Doctorado (210279) y al donativo otorgado “Proyecto 254686”.

Al COMECYT, por otorgarme la beca de titulación.

Al FINNOVA (224222), por otorgar financiamiento para terminar este proyecto.

Al Dr. Daniel Martínez-Fong por su apoyo, enseñanzas y direccionamiento académico.

A la Biol. María de Lourdes Escobedo Sánchez, por sus enseñanzas y realización de técnicas de ingeniería molecular.

Al Biol. José Ayala Dávila, por sus enseñanzas en el uso y manejo de administración estereotaxia y animales de laboratorio.

A la M. en C. Minerva Maldonado Berny, por sus enseñanzas en el uso y manejo de técnicas cromatográficas.

A Ignacio Aráoz Martínez, por su apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto.

A Ángel Marín Huerta, por su apoyo en el mantenimiento de equipos de cómputo.

Al MVZ Benjamín Chávez Álvarez y MVZ Ricardo Gaxiola Centeno (UPEAL-CINVESTAV), por el cuidado de los animales de laboratorios que se usaron en este proyecto.

A mis asesoras y asesores de tesis, Dra. María del Refugio García Villegas, Dra. América Alejandra Padilla Viveros, Dr. Jorge Aceves Ruíz y Dr. Juan Antonio González Barrios; por su tiempo dedicado en la revisión, comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

Resumen

El poliplex de neurotensina (NTS-poliplex) es un sistema de nanopartículas de transferencia génica que ha sido utilizado con éxito para transferir genes neurotróficos en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson, así como genes suicidas en un modelo animal de cáncer. La transferencia génica del factor neurotrófico derivado de células gliales de origen humano (hGDNF) mediada por las NPs de NTS-poliplex restaura funcionalmente el sistema dopaminérgico nigroestriatal en modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, los altos niveles de expresión sostenida de GDNF eventualmente pueden causar efectos nocivos. En el presente trabajo, reportamos un sistema inducible de NPs de NTS-poliplex mejorado, que permite la regulación de la expresión de hGDNF en las neuronas dopaminérgicas.

Construimos NPs de NTS-poliplex que contienen un único plásmido bifuncional que codifica para el transactivador inverso controlado por tetraciclina avanzado (rtTA-Av) bajo el control transcripcional del promotor NBRE3x y para hGDNF bajo el control transcripcional del elemento de respuesta de tetraciclina (TRE). Se construyó también la versión del plásmido bifuncional con el gen para la proteína verde fluorescente (GFP).

Los experimentos de transfección transitoria en células N1E-115, previamente transfectadas con Nurr1 (N1E-115-Nurr1) mostraron que la doxiciclina (100 ng/mL) activa la expresión de hGDNF y GFP. Utilizamos el sistema regulable dual conformado por el par de plásmidos pTet-On-Av + pTRE-Tight-EGFP o el par pTet-On-Av + pTRE-Tight-hGDNF como control positivo de la inducción de la expresión transgénica. El sistema regulable bifuncional, que codifica para GFP o hGDNF, fue dos veces más eficiente que el sistema regulable dual. Inyectamos NPs de NTS-poliplex formadas con los plásmidos bifuncionales en la *substantia nigra pars compacta* de ratas. La administración de doxiciclina (5 mg/kg, i.p.) en ratas activó la expresión de hGDNF sólo en las neuronas dopaminérgicas transfectadas, mientras que la expresión del transgén fue silenciada cuando la doxiciclina se deja de administrar. Importantemente, en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, no se observó expresión basal transgénica en ausencia de Dox. Nuestros resultados ofrecen un sistema específico regulado por doxiciclina, adecuado para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson basado en la nanomedicina.

Abstract

Neurotensin (NTS)-polyplex is a genic transfer system based on nanoparticles that we have successfully used to transfect neurotrophic factors genes in an animal model of Parkinson's disease, as well as suicide genes in an animal model of cancer. The human glial-cell derived neurotrophic factor (hGDNF) gene transfer by NTS-polyplex nanoparticles functionally restores the dopamine nigrostriatal pathway in experimental models of Parkinson's disease. However, sustained high levels of GDNF expression eventually can cause harmful effects. Herein, we report an improved NTS-polyplex nanoparticle system that enables regulation of hGDNF expression within dopaminergic neurons. We constructed NTS-polyplex nanoparticles containing a bifunctional plasmid that codes for the reverse tetracycline-controlled transactivator advanced (rtTA-Adv) under the control of NBRE3x promoter, and hGDNF controlled by the tetracycline-response element (TRE) as well as a bifunctional plasmid contained the enhanced green fluorescent protein (GFP) gene.

Transient transfection experiments in N1E-115 cells, previously transfected with Nurr1 (N1E-115-Nurr1 cells) showed that doxycycline (100 ng/mL) activates hGDNF and GFP expression. We used the dual regulatable system consisting of the two plasmids pTet-On-Adv + pTRE-Tight-EGFP or pTet-On-Adv + pTRE-Tight-hGDNF as a positive control of the transgenic expression induction. The bifunctional regulatable system encoding hGDNF or GFP was twice more efficient than the dual regulatable system. We injected NTS-polyplex nanoparticles in the *substantia nigra pars compacta* of rats.

Doxycycline (5 mg/kg, i.p.) administration in rats activated hGDNF expression only in transfected dopaminergic neurons, whereas doxycycline withdrawal silenced transgene expression. Importantly, in both *in vitro* and *in vivo* assays, transgenic basal expression was not observed in the absence of Dox. Our results offer a specific doxycycline-regulated system suitable for nanomedicine-based treatment of Parkinson's disease.

Tabla de Contenido

	Página
Dedicatorias.....	III
Agradecimientos.....	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VI
Tabla de contenido.....	VII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas.....	XIII
Lista de abreviaturas.....	XIV
1. Introducción.....	1
1.1. La Enfermedad de Parkinson (EP).....	1
1.2. Nanopartículas de NTS-poliplex: sistema de transferencia génica.....	7
1.3. Envío dirigido de genes a neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo.....	9
1.4. Aplicación de las nanopartículas de NTS-poliplex en la terapia neurotrófica en un modelo animal de la Enfermedad de Parkinson.....	10
1.5. Efectos nocivos al Sistema Nervioso Central por la sobre-expresión prolongada de transgenes neurotróficos.....	12
1.6. Regulación de la expresión de genes por el sistema Tet-On Avanzado.....	13
1.7. El promotor del transportador de dopamina.....	17
1.7.1. El factor de transcripción Nurr1.....	18
2. Planteamiento del problema.....	20
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos.....	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos particulares.....	22
5. Materiales y métodos.....	23
5.1. Cultivos celulares y animales.....	23
5.2. Plásmidos.....	24
5.2.1. Construcción del plásmido pNBRE3x-EGFP.....	24

5.2.2.	Construcción del plásmido pNBRE3x-hGDNF.....	25
5.2.3.	Construcción del plásmido pNBRE3x-Tet-On-Avanzado.....	25
5.2.4.	Construcción del plásmido pTRE-Tight-EGFP.....	25
5.2.5.	Construcción del plásmido pTRE-Tight-hGDNF.....	26
5.2.6.	Construcción del plásmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP.....	26
5.2.7.	Construcción del plásmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF.....	26
5.3.	Amplificación y purificación de los plásmidos.....	27
5.4.	Síntesis del acarreador de neurotensina: NTS-PLL-PF.....	27
5.4.1.	Formación del conjugado PLL-SPDP y PLL-SPDP-SH.....	28
5.4.2.	Formación del conjugado NTS-SPDP.....	29
5.4.3.	Formación del conjugado PF-SPDP.....	30
5.4.4.	Formación del conjugado NTS-PLL-SPDP.....	30
5.4.5.	Formación del sistema de nanopartículas de NTS-poliplex.....	31
5.4.5.1.	Acople electrostático entre el DNAp y el PK.....	32
5.4.5.2.	Acople electrostático entre el acarreador de NTS y el DNAp-PK.....	32
5.5.	Propiedades físicas de las nanopartículas de NTS-poliplex.....	33
5.5.1.	Microscopía electrónica de barrido	33
5.5.2.	Determinación del tamaño de partícula y potencial zeta.....	33
5.6.	Transfecciones.....	33
5.6.1.	<i>In vitro</i>	33
5.6.1.1.	Transfección del plásmido pCMV-Script-Nurr1 en células N1E-115 (obtención de la clona N1E-115-Nurr1).....	34
5.6.1.2.	Determinación de las concentraciones molares óptimas del complejo DNAp-PK.....	34
5.6.1.3.	Construcción de las nanopartículas de NTS-poliplex.....	35
5.6.1.3.1.	Determinación de las concentraciones molares óptimas del complejo DNAp-PK-Acarreador de NTS.....	35
5.6.1.3.2.	Transfección de los plásmidos del sistema regulable mediante las nanopartículas de NTS-poliplex.....	35
5.6.1.4.	Ensayos de doble inmunofluorescencia indirecta.....	36

5.6.2. <i>In vivo</i>	37
5.6.2.1. Sitio de inyección en la <i>substantia nigra pars compacta</i> de rata.....	37
5.6.2.2. Transfección de las neuronas dopaminérgicas de la <i>substantia nigra pars compacta</i> de rata.....	38
5.6.2.3. Ensayos de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	38
5.6.2.4. Ensayos de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR).....	39
5.6.2.5. Ensayos de doble o triple inmunofluorescencia indirecta.....	40
5.6.3. Análisis estadístico.....	41
6. Resultados.....	42
6.1. Caracterización de los plásmidos construidos.....	42
6.2. Transfección del plásmido pCMV-Script-Nurr1 en células N1E-115	46
6.3. Síntesis del acarreador de neurotensina.....	47
6.4. Construcción de las nanopartículas de NTS-poliplex.....	50
6.4.1. Ensayos de retardo electroforético de los plásmidos de interés.....	50
6.4.2. Ensayos de retención electroforética de los plásmidos de interés.....	52
6.4.3. Propiedades físicas de las nanopartículas de NTS-poliplex con los plásmidos bifuncionales	55
6.5. Evaluación de la actividad del promotor NBRE3x en células N1E-115-Nurr1.....	56
6.6. Actividad <i>in vitro</i> del sistema regulable Tet-On-Avanzado dual y bifuncional que codifica para GFP	58
6.7. Actividad <i>in vitro</i> del sistema regulable Tet-On-Avanzado dual y bifuncional que codifica para hGDNF.....	60
6.8. Localización celular del hGDNF expresado en células N1E-115-Nurr1.....	62
6.9. Presencia de Nurr1 en las neuronas dopaminérgicas de la <i>substantia nigra pars compacta</i> de rata	64
6.10. Sitio de inyección en la <i>substantia nigra pars compacta</i> de rata.....	66

6.11.	Actividad del promotor NBRE3x en neuronas dopaminérgicas de la <i>substantia nigra pars compacta</i> de rata	67
6.12.	Inducción de la expresión transgénica en neuronas dopaminérgicas de la <i>substantia nigra pars compacta</i> de rata.....	69
6.13.	Regulación de la expresión transgénica en neuronas dopaminérgicas de la <i>substantia nigra pars compacta</i> de rata.....	74
7.	Discusión.....	80
8.	Conclusiones.....	85
9.	Perspectivas.....	86
10.	Bibliografía.....	87
Apéndice A.	Lipofectamina 2000 utilizada como sistema de transfección para evaluar la funcionalidad de los nuevos plásmidos clonados	98
Apéndice B.	Evaluación de la actividad del promotor NBRE3x en células N1E-115-Nurr1.....	99
Apéndice C.	Especificidad del promotor NBRE3x en células N1E-115-Nurr1.....	101
Apéndice D.	Actividad del sistema regulable dual Tet-On Avanzado original, modificado (NBRE3x) y bifuncional evaluado con GFP en células N1E-115-Nurr1, transfectado con Lipofectamina 2000.....	102
Apéndice E.	Actividad del sistema regulable Tet-On Avanzado original y bifuncional hGDNF en células N1E-115-Nurr1, mediante Lipofectamina 2000.....	105

Lista de figuras

Figura 1. Esquema representativo de los componentes del sistema de nanopartículas de NTS-poliplex.

Figura 2. Mecanismo de acción de las instrucciones celulares del sistema de nanopartículas de NTS-poliplex.

Figura 3. Esquema representativo de la regulación de la expresión génica del sistema Tet-On-Avanzado original y modificado.

Figura 4. Funcionamiento del sistema regulable bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-transgén específico para neuronas dopaminérgicas nigrales.

Figura 5. Perfiles de restricción enzimática de los plásmidos construidos.

Figura 6. Mapas de los plásmidos construidos.

Figura 7. Modificación genética de las células N1E-115 para que expresen Nurr1 (N1E-115-Nurr1) mediante la transfección del plásmido pCMV-Script-Nurr1.

Figura 8. Cromatogramas de purificación de los conjugados NTS, PF, y PLL, con SPDP.

Figura 9. Ensayos de retardo electroforético de los diferentes plásmidos construidos.

Figura 10. Ensayos de retención electroforética de los diferentes plásmidos construidos.

Figura 11. Características físicas de las nanopartículas de NTS-poliplex conteniendo los plásmidos bifuncionales.

Figura 12. Actividad del promotor NBRE3x en células N1E-115-Nurr1.

Figura 13. Expresión de GFP inducida por el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP en células N1E-115-Nurr1.

Figura 14. Expresión de hGDNF inducida por el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF en células N1E-115-Nurr1.

Figura 15. Colocalización del hGDNF expresado en células N1E-115-Nurr1 con Golgin-97.

Figura 16. Expresión endógena de Nurr1 en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de rata.

Figura 17. Sitio de inyección en la *substantia nigra pars compacta* de rata.

Figura 18. Expresión transgénica activada por el promotor NBRE3x en neuronas dopaminérgicas de rata.

Figura 19. Actividad del plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de rata.

Figura 20. Actividad del plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de rata.

Figura 21. Regulación de la expresión de hGDNF en las neuronas dopaminérgicas nigrales transfectadas con el plásmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF.

Figura 22. La doxiciclina no induce efectos neurotróficos o deletéreos sobre las neuronas dopaminérgicas.

Lista de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los transcritos de interés.

Tabla 2. Concentraciones usadas para formar las nanopartículas de NTS-poliplex en los ensayos *in vitro*.

Tabla 3. Concentraciones usadas para formar las nanopartículas de NTS-poliplex en los ensayos *in vivo*.

Tabla 4. Dosis de doxiciclina administrada utilizando el sistema Tet-On en el sistema nervioso central.

Lista de abreviaturas

Siglas	Significado
°C	Grados celcius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micrómetros
Amp (R)	Gen de resistencia para la ampicilina
AP	Anteroposterior
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Albumina Sérica Bovina
Buffer TE	Amortiguador Tris-EDTA
cDNA	DNA complementario
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
Dox	Doxiciclina
D.O.	Densidad Óptica
Da	Daltones
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DV	Dorso-ventral
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EP	Enfermedad de Parkinson
EGFP	Proteína Verde Fluorescente
G-418	Gentamicina 418
hDAT	Transportador de dopamina de origen humano
hGDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía de origen humano
6-OHDA	6-hidroxidopamina
im	Intramuscular

ip	Intraperitoneal
kDa	Kilodaltones
kpb	kilopares de bases
LC-SPDP	Entrecruzador bifuncional N-succinimidil-3-[2-[piridilditio] propionato
MCS	Sitio Múltiple de clonación
ML	Medio-lateral
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MM	Marcador de peso molecular
NBRE	Elemento de respuesta a nurr1
NaCl	Cloruro de Sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de sodio
Neo (R)	Gen de resistencia a la neomicina
NHS	N-hidroxisuccinimida
nm	Nanómetros
NPs	Nanopartículas
NTRN	Neurturina
NTSR1	Receptor a neurotensina tipo 1
NTS	Neurotensina
NTS-poliplex	Poliplex de neurotensina
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pb	Pares de bases
pCMV	Promotor de citomegalovirus
DNAp	DNA plasmídico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PF	Péptido Fusogénico
pH	Potencial de Hidrógeno
PK	Péptido Cariofílico
PLL	Poli-L-lisina

PM	Peso Molecular
pSV40	Promotor del virus SV40
R.M.O.	Relación molar optima
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RT-PCR	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
rtTA-Av	Transactivador transcripcional reverso controlado por tetraciclina avanzado
SBF	Suero bovino fetal
SNC	Sistema nervioso central
SN _{pc}	Substantia nigra pars compacta
SN _{pr}	Substantia nigra pars reticulata
TAE	Amortiguador de Tris-acetato-EDTA
TA	Temperatura ambiente
TH	Tirosina Hidroxilasa
T _m	Temperatura de fusión
TRE _m	Elemento de respuesta a tetraciclina modificado
tTS	Silenciador transcripcional controlado por tetraciclina
VMAT2	Transportador monoamínico vesicular 2
VTA	Área ventral tegmental

1. Introducción

1.1 La Enfermedad de Parkinson (EP).

En las próximas décadas la población mundial de personas de mayor edad tenderá a crecer, conjuntamente con un incremento en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas para las cuales en general se carece de tratamientos efectivos, por lo que son candidatas para ser abordadas por las nuevas estrategias en terapia génica. Estas técnicas aún se encuentran en las primeras etapas de desarrollo, con muchas características que han de ser perfeccionadas, tanto en el diseño de los transportadores como en las formas de envío como en la regulación de la expresión de los diferentes transgenes terapéuticos.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un deterioro progresivo de una población neuronal específica, que ocurre durante un periodo de tiempo extenso, y típicamente se manifiesta con proteínas anormales dentro del cerebro. Los desórdenes neurodegenerativos son un grupo muy heterogéneo, sus fenotipos clínicos los hacen enfermedades distinguibles pero aún son difíciles de diagnosticar en sus etapas iniciales. Aunque la neurodegeneración ocurre en el cerebro normal a consecuencia de la senectud, se acelera en la condición de enfermedad, apareciendo los síntomas crónicos, que son devastadores para el paciente, para sus familias y para la sociedad debido a su gran costo en la atención del enfermo.

La EP es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente que afecta al 1% de la población mundial mayor a 60 años [1]. Su inicio se presenta durante la sexta y la séptima década de la vida. El deceso se presenta comúnmente 10 años después del inicio de la enfermedad, con una edad promedio de muerte de 75 años. Su etiología aún es desconocida sin embargo hay teorías que apuntan directamente al estrés oxidativo mitocondrial como la principal causa. La EP puede iniciar en cuatro formas distintas: 1) Desorden de la marcha: se caracteriza por el movimiento asimétrico de los brazos, lentitud asimétrica, desbalance mínimo a ausente y con arrastre de los pies. 2) Una pierna débil o torpe: la destreza de golpeteo de los dedos o pulgares de los pies presenta una cadencia irregular que se incrementa conforme el ejercicio continúa. La amplitud de movimiento y velocidad se encuentran progresivamente reducidas. Los movimientos finos son los primeros en

ser afectados al igual que los movimientos repetitivos. 3) Pierna con disconfort o rígida. Puede presentarse un malestar o dolor en una pierna, de carácter vago.

4) Tremor al descanso con una frecuencia de 4-6 Hertz, que generalmente desaparece con el movimiento voluntario. Se presenta comúnmente en la mano y es normalmente asimétrico. También puede presentarse solamente en mandíbula, mentón o lengua por afectamiento de los músculos craneales. La reducción de la amplitud y velocidad en la mano producida por temores ocasiona que éstos tengan una escritura pequeña e irregular. 5) La acinesia o bradicinesia se caracteriza por la lentitud de los movimientos voluntarios y reducción progresiva de la velocidad y amplitud de los movimientos repetitivos. Es el aspecto más incapacitante de la EP; los pacientes la describen como retraso en la iniciativa motora, debilidad y fatigabilidad al reiterar los movimientos, enlentecimiento en la realización de las tareas, etc., que afecta a muchos aspectos motores de su vida diaria, tales como vestirse, asearse, comer, realización de actividades manuales, etc.; exigiéndoles su ejecución, mucho más tiempo del que para ellos era habitual. 6) La hipocinesia o pobreza de movimientos y reducción de su amplitud; se pierde la destreza para abrocharse la ropa, anudarse la corbata, escribir, realizar labores finas con los dedos, en general todo lo que exige ejecutar acciones simultáneas o acciones secuenciales. Más allá de este núcleo central de signos, la EP se asocian a otros aspectos clínicos, como pobreza de la expresión facial, hipomimia, asociada con mirada de consternación y reducción de la frecuencia de parpadeo; o una curiosa transformación de la escritura, con tendencia progresiva a reducir el tamaño de sus rasgos, hasta volverse minúscula. La “festinación” es otro aspecto clínico que se caracteriza por una aceleración progresiva e involuntaria de la marcha. Además, se puede presentar el fenómeno de congelación o "freezing", que se caracteriza por la dificultad en el inicio y continuación de movimientos repetitivos rítmicos (hablar, escribir, caminar). Se considera un signo clínico independiente de la acinesia [2].

Epidemiológicamente, la EP afecta a 1-2% de la población mayor de 65 años y a 3-5% de la mayor de 85 años. Su incidencia oscila del 8.6 a 19.0 casos por cada 100 mil habitantes por año. Antes de los 50 años de edad, proximadamente 4 % de los pacientes inician con la enfermedad. El incremento del riesgo de padecer EP es de 3 a 4 veces mayor para los familiares de éstos paciente, comparados con el resto de la población [3,4]. Además de los síntomas motores, se ha observado

en pacientes parkinsonianos desórdenes mentales como la depresión o psicosis, alucinaciones, fatiga, dolor, así como disfunción autonómica y gastrointestinal [5,6].

Desde el punto de vista histológico, la EP se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) [5], las cuales proyectan hacia los núcleos caudado y putámen (estriado en roedor), globo pálido, SNpc, *substantia nigra pars reticulata* (SNpr) tálamo, subtálamo y la corteza prefrontal y límbica [7-9] . Esta pérdida neuronal, conlleva a la disminución de los niveles de dopamina (DA) en el putamen, y es directamente proporcional a la severidad de la rigidez postural y la bradicinesia. Se requiere una pérdida de aproximadamente el 80 % de la transmisión dopaminérgica para que aparezcan los síntomas. Histológicamente en la EP se presentan los denominados cuerpos de Lewy en la *substantia nigra* (que contienen cúmulos de la proteína alfa-sinucleína) y el locus coeruleus, aunque también pueden aparecer en otras regiones del sistema extrapiramidal. Los cuerpos de Lewy con inclusiones intracitoplasmáticas compuestas de proteínas, ácidos grasos libres, esfingomielina y polisacáridos [10,11].

Los tratamientos actuales de la EP se enfocan a disminuir las alteraciones motoras y desatienden los trastornos cognitivos por lo difícil que resulta regularlos en la EP con los fármacos convencionales. Las terapias con L-DOPA o agonistas dopaminérgicos (terapia de remplazo), o con medicamentos sintomáticos [12], son efectivas temporalmente, pero generan tolerancia y severos efectos adversos [13] y su efecto no es tan eficaz en los pacientes con Parkinson avanzado [14].

La discinesia es el deterioro de poder realizar movimiento voluntario, por lo que resulta en movimientos fragmentarios o incompletos. La teoría más popular de la fisiopatología de la discinesia tardía inducida por neurolepticos, se atribuye al trastorno del movimiento por la supersensibilidad del receptor de dopamina postsináptica, aunque ésta es sólo una hipótesis basada en pruebas circunstanciales [15]. En adición, la discinesia es un efecto secundario grave que ocurre cuando se consumen medicamentos llamados “neurolepticos”, llamados también “anti-psicóticos o tranquilizantes mayores”, que se usan para tratar problemas mentales. A menudo ocurre cuando se consume el medicamento durante varios meses o años [16].

Actualmente, el tratamiento de las discinesias a base de fármacos o palidotomía es insatisfactorio, lo mismo sucede con la estimulación profunda cerebral que se utiliza para tratar los síntomas motores [17,18]. La desventaja fundamental de los tratamientos farmacológicos actuales no es la tolerancia ni los síntomas secundarios sino la incapacidad de detener el avance de la neurodegeneración [9,19].

El incremento en la producción de DA también puede conseguirse utilizando terapia génica. En este caso, se utilizan generalmente vectores virales para transferir las secuencias codificantes para enzimas involucradas en la síntesis del neurotransmisor, tales como por ejemplo la tirosina hidroxilasa (TH) que convierte la tirosina en L-DOPA, la guanosín trifosfato ciclohidrolasa (GTP CH1) que es la enzima que limita la tasa de biosíntesis del cofactor para la TH, así como la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) que convierte la L-DOPA en DA dentro de las vesículas sinápticas [20,21]. La terapia génica de remplazo del neurotransmisor DA es poco atractiva para utilizarse en la EP ya que también tiene la desventaja de que las enzimas transgénicas no detienen el avance de la neurodegeneración dopaminérgica.

Kaplitt y colaboradores (2007), reportaron un estudio clínico sobre la seguridad y tolerabilidad del uso de un virus adenoasociado (AAV) para transferir al gen de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) al núcleo subtalámico; con seguimiento de un año. Los pacientes con EP sometidos al tratamiento, mejoraron su respuesta motora sin presentarse eventos adversos [22]. Sin embargo, el uso de AAV en otros estudios de terapia génica han presentado desarrollo de inmunidad humoral y celular contra las proteínas de la cápside del vector con la consecuente pérdida del gen terapéutico [23,24], Además, se considera persistente el riesgo de presentarse toxicidad, pues en otros ensayos se han presentado hemorragias e incluso la muerte del paciente [24]. Se suman a estas desventajas la carencia de especificidad celular de la transducción del vector AAV-GAD y la incapacidad natural de la enzima GAD para detener el avance de la neurodegeneración dopaminérgica.

La estrategia más promisoriosa para curar o prevenir la EP es la terapia neurotrófica [22,25]. A diferencia de los tratamientos de reemplazo o paliativos, la terapia neurotrófica tiene el potencial para detener la muerte neuronal y, simultáneamente, promover la regeneración funcional de la innervación dopaminérgica en los núcleos involucrados en funciones motoras, cognitivas y afectivas [9]. Esta terapia utiliza factores neurotróficos que actúan sobre las neuronas dopaminérgicas residuales para promover en ellas la supervivencia neuronal y el crecimiento axonal. De este tipo de factores neurotróficos, solamente se han ensayado en el humano, dos de la familia de los ligandos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF): el GDNF y la neurturina (NRTN) [9,26]. La terapia neurotrófica se puede realizar utilizando inyecciones repetidas o infusión continua de la proteína o por la transferencia de un gen que codifica para el factor neurotrófico (terapia génica) [9,26] .

Un número creciente de trabajos han demostrado que la infusión de proteínas neurotróficas recombinantes produce mejoría de las alteraciones morfológicas, bioquímicas y conductuales en modelos animales de la EP [27,28]. En estudios clínicos fase 1 en pacientes con EP, se administró durante 1 año GDNF recombinante por infusión en uno de los núcleos putámenes de los pacientes [29]. Aunque hubo mejoría en los “scores” de UPDRS, el beneficio se perdió a los 9 meses de haberse retirado la infusión de GDNF [29]. Estos resultados sugieren que la administración del GDNF en sólo uno de los núcleos de proyección de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc no ejerció el efecto neurotrófico suficiente ni en los cuerpos neuronales ni en los otros núcleos blanco de innervación dopaminérgica, pues un efecto neurotrófico efectivo se tiene que ejercer en el cuerpo de las neuronas para proveer supervivencia celular y paralelamente en sus terminales axonales para inducir reinervación funcional. Además, considerando que la innervación dopaminérgica de la SNpc al cerebro es muy amplia, la infusión de la proteína neurotrófica se tendría que administrar en ambas SNpc y cuando menos en los dos núcleos caudoputámenes, aunque idealmente, debería también incluir los otros núcleos de los ganglios basales y la corteza cerebral que también son inervados por las neuronas dopaminérgicas nigrales. Ante la imposibilidad de realizar infusiones de la proteína neurotrófica en varios núcleos cerebrales, la estrategia alterna es utilizar terapia génica pues tienen la ventaja de proveer niveles sostenidos de la proteína neurotrófica después de la administración única de su gen (terapia génica neurotrófica) [9,26].

La neurturina (NRTN) se ha administrado por terapia génica mediante el vector viral adenoasociado serotipo 2 (AAV2-NRTN) también en el núcleo caudoputamen de pacientes humanos con EP [30]. Los resultados de este estudio fueron modestos [31] en comparación a los resultados obtenidos en diferentes modelos animales de parkinsonismo agudo tratados con el mismo vector viral [32-34]. El fracaso clínico de la terapia génica viral [35] y de la infusión de GDNF recombinante [29] se debió al diseño equivocado de la administración del vector viral y de la proteína recombinante. El núcleo caudoputamen como blanco terapéutico proporciona una fuente de la proteína neurotrófica (GDNF o NRTN), pero las escasas terminales dopaminérgicas en el núcleo caudoputamen del enfermo parkinsoniano ocasionan un pobre transporte axonal de la proteína neurotrófica hacia las neuronas de la SNpc donde se requiere para promover la supervivencia neuronal y estimular la síntesis de las proteínas del citoesqueleto axonal [31,32,35]. Por otro lado, la proteína neurotrófica generada en el núcleo caudoputamen es incapaz de difundir largas distancias en el cerebro humano y superar barreras infranqueables como enzimas proteolíticas extracelulares, la gran masa de mielina de la cápsula interna e interacciones electrostáticas inespecíficas con otras estructuras, para poder alcanzar los otros núcleos que inervan las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

Los autores de la terapia génica usando el vector viral AAV2-NRTN, manifiestan la intención de aplicar dicha terapia génica directamente en la SNpc o conjuntamente en la SNpc y en el núcleo estriado (ST) [32,35]. Recientemente, Martínez-Fong y colaboradores, han propuesto que no basta aplicar la terapia génica en el SNC donde se pueden transfectar diferentes estirpes celulares residentes en ese núcleo si el vector génico carece de especificidad celular, sino que se debe transfectar el gen neurotrófico en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc supervivientes a la neurodegeneración, para que la proteína transgénica liberada pueda actuar en el soma neuronal y en las terminales axonales después de ser transportada anterogradamente [9]; de esta manera, se proveerá supervivencia en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y, simultáneamente, estimulación del crecimiento axonal en los núcleos cerebrales que inervan [9].

Entre los vectores génicos virales y no virales que se han utilizado hasta hoy en el cerebro, el poliplex de neurotensina (NTS-poliplex), destaca por su habilidad de transferir genes terapéuticos a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc a través de la internalización del receptor de neurotensina tipo 1 (NTSR1) que está presente en la membrana celular de estas neuronas.

1.2 Nanopartículas de NTS-poliplex: Sistema de transferencia génica

En fechas recientes, las nanopartículas (NPs) sintéticas de transferencia génica han surgido como una prometedora alternativa a los vectores virales para aplicaciones en terapia génica de la EP [9,36]. El NTS-poliplex es un sistema de NPs de transferencia génica no viral [37] con aplicación potencial en la nanoterapia neurotrófica para la EP [9,38].

Este nanovector tiene la ventaja de transferir genes (transfectar) directamente a las neuronas dopaminérgicas nigrales [7,39,40] y a células cancerosas [41-43], vía la internalización del receptor a neurotensina (NTS) tipo 1 (NTSR1) [7,41-43] (Patentes Mexicanas # 264932 y # 287089), además es capaz de transfectar neuronas dopaminérgicas en cultivo primario [39], y de la SNpc, incluso si éstas han sido expuestas a agentes neurotóxicos [38,44,45]. El NTS-poliplex son NPs que resultan de la compactación del DNA (ácido desoxirribonucleico, por sus siglas en inglés) por las uniones electrostáticas del péptido cariofílico Vp1 de SV40 (PK) y del acarreador de NTS; éste es un conjugado de poli-L-lisina con la NTS y el péptido fusogénico HA2 de la hemaglutinina (PF) [41,46,47]. Diversos trabajos describen el papel que juegan los componentes del NTS-poliplex en la transferencia génica. En resumen, el acarreador de NTS (NTS-acarreador) activa la internalización del NTSR1, promoviendo la internalización de las NPs de NTS-poliplex [7,37,39,40,42]. El PF rescata a las NPs de NTS-poliplex de la degradación endosomal, y el PK dirige al DNAp (DNA plasmídico) al núcleo celular [9,40,41,43,46]. Las principales propiedades biofísicas de las NPs de NTS-poliplex se han caracterizadas utilizando estudios de marcaje con radioactividad, análisis electroforético y técnicas de microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido por emisión de campo [9,39,41,46,47]. Estos estudios han mostrado que las NPs de NTS-poliplex son de forma toroide, con un diámetro de 50 a 150 nm y tienen carga eléctrica neutra [9,41,46,47]. En la Figura 1 se ilustra un esquema representativo de los componentes del sistema de NPs de NTS-poliplex.

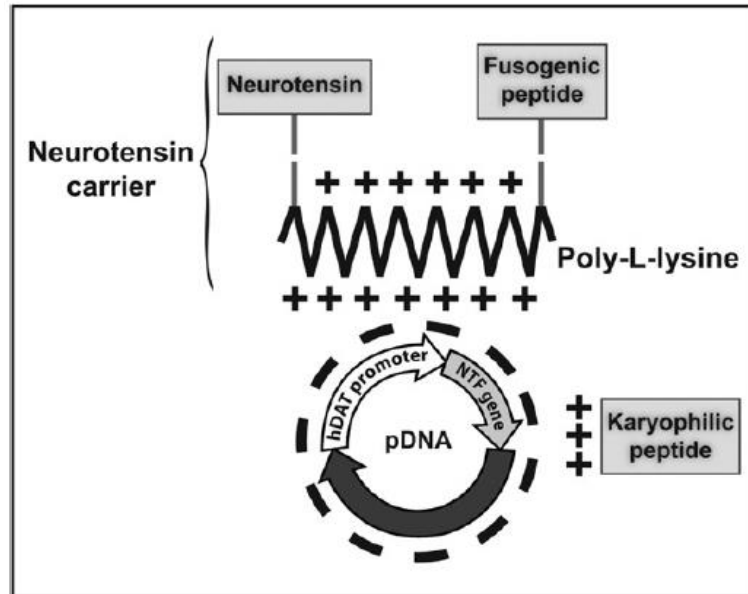


Figura 1. Esquema representativo de los componentes del sistema de nanopartículas de NTS-poliplex.

El acarreador de neurotensina consiste del conjugado de neurotensina y del péptido fusogénico con la poli-L-lisina (PLL), que forma el complejo NTS-PLL-PF. El péptido cariófilico (PK) se une electrostáticamente al DNAp, para formar el complejo DNAp-PK, que a su vez se une al complejo NTS-PLL-PF para finalmente formar las NPs de NTS-poliplex. El DNAp contiene el gen de interés bajo el control transcripcional de un promotor tejido específico. Por ejemplo, hDAT (promotor del transportador de dopamina humano, por sus siglas en inglés), un promotor específico de neuronas dopaminérgicas. (Tomado de: Martínez-Fong., et al, 2012).

La Figura 2 ilustra los eventos celulares sugeridos para la transferencia génica efectuada por los dominios peptídicos presentes en las NPs de NTS-poliplex: 1) Activación de la endocitosis del receptor NTSR1 por la NTS, 2) Rescate oportuno de las NPs de NTS-poliplex de la acidez endosomal, por el PF, 3) Direccionamiento nuclear de las NPs por el PK y 4) Control natural de la expresión transgénica por el promotor tejido específico.

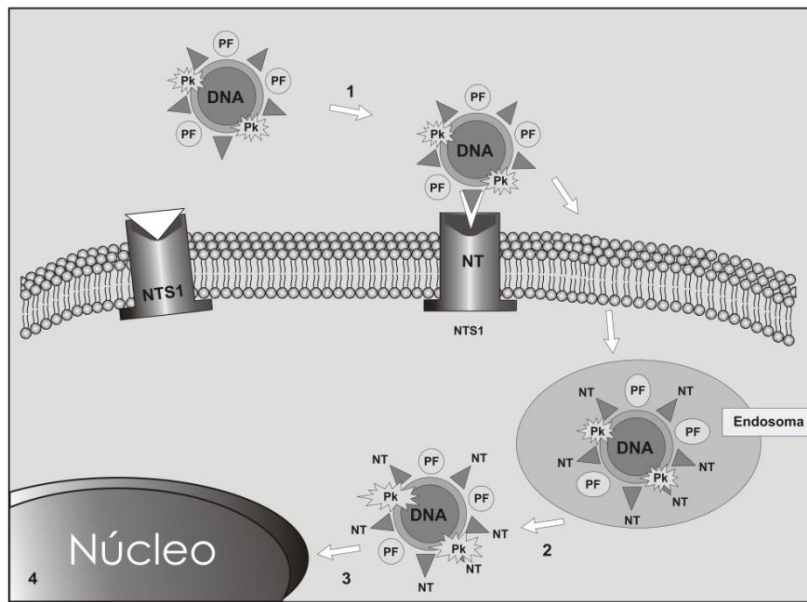


Figura 2. Mecanismo de acción de las instrucciones celulares de las nanopartículas de NTS-poliplex.

El receptor NTSR1 es activado por la NTS que está expuesta en la superficie de las NPs de NTS-poliplex, induciendo su internalización. En el endosoma, el PF induce el rescate oportuno del NTS-poliplex de la vesícula endocítica, provocando su liberación al citoplasma. En el citoplasma, el PK interviene en el direccionamiento del DNAP hacia el núcleo celular en donde se lleva a cabo la transcripción del gen foráneo (transgén).

1.3 Envío dirigido de genes a neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo

El envío de transgenes en el cerebro no está exento de riesgo, ya que es un procedimiento invasivo e irreversible, y aún se desconocen sus efectos colaterales a largo plazo. Aunque las NPs de NTS-poliplex son altamente específicas [7,38,40,46], hemos restringido más la expresión transgénica a las neuronas dopaminérgicas por la inclusión del promotor del gen del transportador de dopamina de origen humano (hDAT) [9,44-46] .

La aplicación de las NPs de NTS-poliplex en la terapia génica (nanoterapia) para la EP se basa en que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc expresan alta densidad de NTSR1 [9,48]. Este receptor se localiza tanto en el soma como en las terminales axónicas de las neuronas dopaminérgicas [49,50]. En ambos casos el receptor NTSR1 se internaliza cuando es activado por la NTS y es transportado hasta el soma de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Nuestro grupo de investigación ha utilizado ambas vías fisiológicas de internalización y transporte del receptor NTS1 para transferir genes a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

La participación del transporte del receptor NTSR1 del soma neuronal explica la expresión transgénica en neuronas dopaminérgicas de la SNpc cuando las NPs NTS-poliplex son inyectadas localmente [7,38,40], mientras que el transporte retrógrado explica la expresión transgénica en estas mismas neuronas cuando las NPs de NTS-poliplex son inyectadas en el núcleo ST [46].

La vía de internalización retrógrada del receptor NTSR1 ha sido muy útil para demostrar otro punto de especificidad otorgado a las NPs de NTS-poliplex, como es el uso de un promotor tejido específico. Inyectando en el núcleo ST de rata las NPs de NTS-poliplex formado con el plásmido que codifica para el transgén neurotrófico BDNF-flag (factor neurotrófico derivado del cerebro, por sus siglas en inglés fusionado a una etiqueta flag) bajo el control transcripcional del promotor hDAT, hemos demostrado la expresión de BDNF-flag en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc pero no en las neuronas estriatales, que se sabe también expresan el receptor NTSR1 [51]. A su vez, hemos demostrado que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc son capaces de expresar al transgén reportero de la proteína verde fluorescente (GFP), que se encuentra bajo el control transcripcional del promotor hDAT, en ratas sanas [46], cuando las NPs de NTS-poliplex son inyectadas directamente en la SNpc. Utilizando el transgén reportero GFP se ha demostrado su expresión por hasta tres meses [40] o 6 meses posterior a la transfección (al tiempo del estudio) [45]. A su vez, hemos demostrado alta eficiencia de transfección del transgén GDNF-flag en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [38]. Entonces, las NPs de NTS-poliplex en la nanoterapia neurotrófica se han usado para transferir un gen neurotrófico con el objetivo de promover la supervivencia neuronal y la restauración de la vía dopaminérgica nigroestriatal [1,9,26,52].

1.4 Aplicación de las nanopartículas de NTS-poliplex en la terapia neurotrófica en un modelo animal de la Enfermedad de Parkinson

En la EP las neuronas dopaminérgicas de la SNpc degeneran de forma progresiva, y responden a los factores neurotróficos GDNF y BDNF mediante la activación de receptores GFR α 1 y trkB, respectivamente [53,54]. Estos factores neurotróficos promueven el mantenimiento y la sobrevivencia de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro adulto, por lo que se han considerado fuertes candidatos para ser aplicados en la terapia génica para la EP [9,55].

Sobre esta base, nuestro grupo demostró la capacidad terapéutica de las NPs de NTS-poliplex en la transferencia de los genes GDNF, BDNF y NRTN en ratas hemiparkinsonianas, generadas por la inyección unilateral de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el núcleo ST [38,44,45,56]. La inyección de esta neurotoxina se realizó en el núcleo ST con el objetivo de afectar la inervación dopaminérgica, en su porción ventrolateral, la cual proviene exclusivamente de la SNpc [56]. Una semana después de inducir la neurodegeneración, se transfectaron neuronas dopaminérgicas de la SNpc del lado lesionado, con las NPs NTS-poliplex conteniendo el gen humano GDNF-flag [38]. En estos animales demostramos por RT-PCR la expresión del transgén GDNF-flag en la SNpc de ratas hemiparkinsonianas [38]. Los estudios neuroquímicos mostraron la recuperación total de los niveles de dopamina en el ST y en forma parcial en la SNpc del lado lesionado. Utilizando el ensayo de autoradiografía de la unión del ligando específico [³H]-WIN-35428 al transportador de DA se demostró la restauración de la inervación dopaminérgica del ST. Por inmunofluorescencia indirecta se confirmó la reinervación estriatal y la sobrevivencia de una proporción significativa de neuronas dopaminérgicas en la SNpc, en comparación a los animales controles lesionados. Además, nuestros resultados mostraron que la transfección con las NPs NTS-poliplex disminuyó las alteraciones motoras de la marcha sin restricción y redujo significativamente ($80 \pm 5 \%$) la conducta de giro inducida por anfetamina o apomorfina. Todos estos resultados en conjunto sugieren que la polifección del gen hGDNF detiene la progresión de la neurodegeneración inducida por 6-OHDA en el sistema dopaminérgico nigroestriatal y promueve su recuperación funcional [38]. Resultados similares se obtienen con la polifección del gen de BDNF-flag [44] y NTRN (Neurturina; Tesis de doctorado de David Reyes Corona) en la SNpc de ratas hemiparkinsonianas. Recientemente demostramos la bioseguridad de las NPs de NTS-poliplex, conteniendo un gen reportero mostrando que no causa inflamación local ni sistémica [47]. Sin embargo, estudios preclínicos, utilizando vectores de transferencia génica virales, han reportado que la sobreexpresión sostenida a largo plazo de proteínas neurotróficas podrían ocasionar efectos nocivos al Sistema Nervioso Central (SNC) [9,57,58].

1.5 Efectos nocivos al Sistema Nervioso Central por la sobre-expresión prolongada de transgenes neurotróficos

En fechas recientes un número creciente de trabajos muestran que el incremento en los niveles de expresión de factores neurotróficos, ya sea por la transfección de éstos, en animales transgénicos que los sobre-expresan o por condiciones patológicas, produce efectos deletéreos al SNC. Esto ha producido un cambio en el modo de cómo se interpreta la acción de los factores neurotróficos. Hasta hace muy poco tiempo, el incremento de los niveles de expresión de factores neurotróficos era considerado como una acción “positiva” que favorece la diferenciación, la plasticidad, la regeneración y la sobrevivencia neuronal [59,60]. Sin embargo, esta visión fue modificada cuando se observó que las neurotrofinas, como BDNF, de manera paradójica podían también inducir muerte por apoptosis en diferentes poblaciones neuronales a través de la activación del receptor p75^{ntr} [61,62]. Hasta la fecha este fenómeno de regulación de muerte y sobrevivencia neuronal mediante neurotrofinas ha sido muy poco estudiado en el SNC de animales adultos [63]. Se sugiere que la relación entre los niveles de los receptores Trk y p75^{NTR} en una neurona, es lo que determina si ésta es conducida a la sobrevivencia o a la apoptosis, al ser expuesta a cierta concentración de BDNF, ya que los receptores TRKs son de alta afinidad, mientras que el receptor p75^{NTR}, es de baja afinidad [61,64]. Recientemente, también se ha reportado que ratones transgénicos de sobre-expresan BDNF a largo plazo en el SNC, presentan impedimentos de aprendizaje y memoria [65,66].

En trabajos recientes donde han utilizando sistemas de transferencia génica virales, informan que la sobre-expresión sostenida a largo plazo de GDNF en ratas lesionadas con 6-OHDA genera ramificaciones aberrantes en neuronas dopaminérgicas nigro-estriatales [57], disminución significativa en la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) en la SNpc y área ventral tegmental (VTA) [67], así como disminución de los niveles de dopamina estriatales [58]. Estos hallazgos indican que la sobre-expresión sostenida a largo plazo del GDNF podrían producir efectos significativamente indeseables al SNC, que pudieran superar sus beneficios. Estos efectos son contrarios a la acción neurotrófica generada por el GDNF y BDNF. Puesto que estos factores neurotróficos son fuertes candidatos para utilizarse en la terapia génica de la EP, es deseable regular su expresión para evitar los efectos nocivos en el SNC y mantener los niveles de expresión de la proteína transgénica dentro del rango de su acción terapéutica [68,69].

1.6 Regulación de la expresión de genes por el sistema Tet-On Avanzado

El éxito de la terapia génica depende de varios factores, incluyendo el sitio de transfección, la duración y la especificidad celular de la expresión transgénica, y muy importantemente, los niveles terapéuticos de la proteína transgénica. Es por ello que se han desarrollado sistemas de regulación génica capaces de controlar la expresión temporal de un gen de interés. Varios autores han sugerido el uso de sistemas regulables inducibles a fármacos y han propuesto que el sistema regulable ideal debe poseer las siguientes características: 1) Expresión transgénica basal en ausencia del fármaco inductor, 2) Alto nivel de expresión del transgén en presencia del inductor, 3) Respuesta rápida a la administración o eliminación del inductor, (4) Insignificante toxicidad, respuesta inflamatoria o inmunogenicidad asociados con los elementos reguladores y (5) Ausencia de toxicidad y buena biodisponibilidad del fármaco inductor. Actualmente, el sistema de inducción con tetraciclina es el más ampliamente usado [70,71], conocido como sistema regulable Tet-Off o Tet-On [72]. En 1995 se desarrolló el sistema de expresión inducible a tetraciclina Tet-On, el cual, en presencia de Doxiciclina (Dox) se “activa” la expresión transgénica, mientras que en ausencia de Dox, se “inactiva” la expresión transgénica [73,74]. El sistema Tet-On surgió de la modificación del sistema Tet-Off desarrollado en 1992 [75], y hasta la fecha es el sistema de expresión génica regulable más utilizado, en células en cultivo y en animales experimentales [71,76,77], así como en una gran variedad de genes de interés en modelos de animales transgénicos [78].

Hasta la fecha, el sistema Tet-On se ha usado exitosamente en diferentes tejidos. Aunque hace más de una década que el sistema Tet-On fue diseñado, nuevas modificaciones al sistema han surgido. Recientemente estas modificaciones han permitido que el control de la expresión del transgén sea más fina en mamíferos [79]. Tres de las modificaciones más relevantes que ha tenido el sistema Tet-On son: 1) Minimizar la expresión basal de la proteína de interés en ausencia de Dox. El sistema denominado silenciador transcripcional controlado por tetraciclina (tTS) es una de las nuevas variantes que se han generado para eliminar la expresión basal del transgén. El tTS ha resultado de una mutante del rtTA que no produce expresión basal y a su vez incrementa la sensibilidad a la Dox. La funcionalidad del sistema tTS ha sido comprobada exitosamente *in vitro* e *in vivo* [79]. 2) Co-regulación de la expresión de dos proteínas de interés simultáneamente mediante una construcción plasmídica bidireccional. 3) Disminución de la expresión basal del transgén en ausencia de Dox.

En el año 2000, se desarrolló el sistema regulable Tet-On-Avanzado (Tet-On-Av), que surgió de la modificación del sistema Tet-On original [80]. El sistema Tet-On-Av está conformado por dos plásmidos (llamado "Sistema regulable Dual"). El primero, el plásmido regulador, pTet-On-Av, codifica para el transactivador transcripcional reverso a tetraciclina avanzado (rtTA-Av). La optimización de este plásmido consistió en la sustitución de varios aminoácidos específicos del operador de tetraciclina (*tetO*) del rTetR-M2, mutación que resultó en el aumento en la sensibilidad a la Dox de por lo menos 10 veces. Otra ventaja del este sistema fue la modificación de la secuencias "FFF", que resultó en la eliminación de su toxicidad causada por la proteína VP16 [80].

Estas mejoras ayudaron a elevar los niveles de expresión nominales de la proteína rtTA-Av, mientras se mantiene su total capacidad de inducción. Se ha reportado que en células en cultivo se requiere una dosis de Dox de 100 ng/ml, que corresponde a una dosis 10 veces menor, comparada con el sistema Tet-On [80]. El rtTA-Av se encuentra bajo el control transcripcional del promotor del citomegalovirus (pCMV).

El segundo, el plásmido inducible, pTRE-Tight-transgén (que codifica para un gén de interés), contiene el elemento de respuesta a tetraciclina modificado (TRE_{mod}) corriente arriba del promotor mínimo del CMV (P_{minCMV}) [81]. Ya que el sistema regulable dual, se conforma de dos plásmidos independientes, es necesario co-transfectar ambos plásmidos a una misma célula, para poder regular la expresión transgénica.

Importantemente, también se ha reportado que para alcanzar los niveles máximos de expresión del gen de interés, en animales transgénicos o en células transfectadas con el sistema Tet-On-Av, se requiere un tiempo menor a 20 o tan solo 8 horas, respectivamente, y que la expresión transgénica *in vivo* declina posterior a las 40 horas de la inducción (Clontech, 2006). Por lo que éste sistema de regulación brinda la ventaja de regular la expresión transgénica en el cerebro, al ser más sensible a la Dox. El sistema Tet-On-Av, solo responde a la Dox y no a la tetraciclina (Tc). En la Figura 3 se ilustra un esquema representativo de la regulación de la expresión transgénica del sistema Tet-On-Avanzado original y modificado.

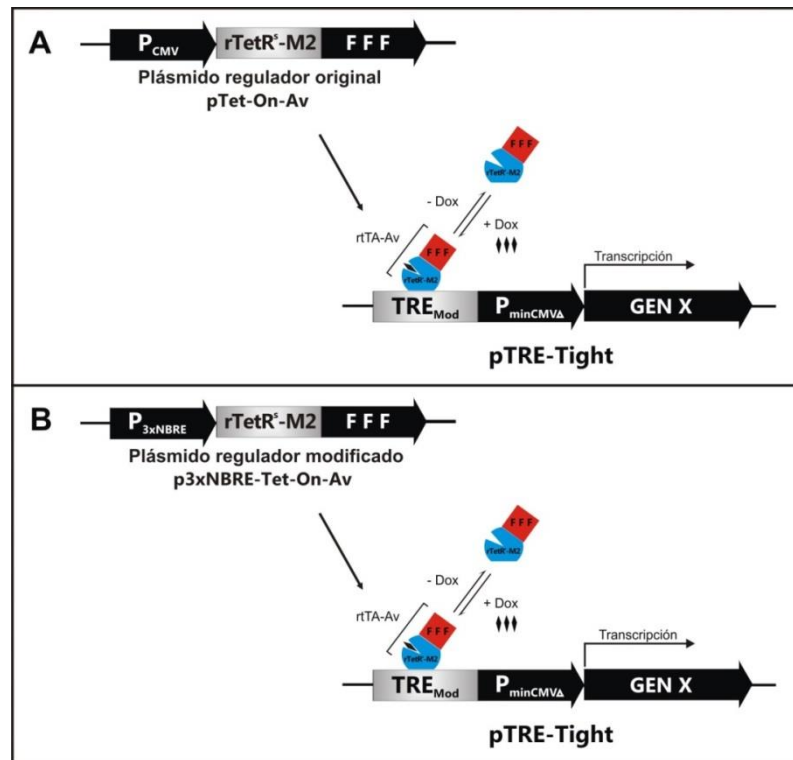


Figura 3. Esquema representativo de la regulación de la expresión génica del sistema Tet-On-Avanzado original y modificado. **A)** El sistema regulable Tet-On-Avanzado consta de los plásmidos pTet-On-Av y el pTRE-Tight. El pTet-On-Av codifica para el transactivador reverso de tetraciclina avanzado (rtTA-Av), que se encuentra bajo el control transcripcional del promotor del citomegalovirus (CMV). El pTRE-Tight contiene el elemento de respuesta a tetraciclina modificado (TRE_{Mod}) localizado corriente arriba del promotor mínimo de citomegalovirus (P_{min}), que codifica para el gen de interés. El rtTA-Av, en presencia de Dox (+ Dox), es capaz de interactuar con su elemento de respuesta induciendo la transcripción del gen de interés, no así en la ausencia de Dox (- Dox). **B)** El sistema regulable pTet-On-Av modificado consta de los plásmidos el pNBRE3x-Tet-On-Av y el pTRE-Tight. El plásmido pNBRE3x-Tet-On-AV fue construido al reemplazar el P_{CMV} del pTet-On-Av por el promotor NBRE3x (Modificado de: Clontech Biotechnology, 2006).

El sistema regulable Tet-On Av, ha sido utilizado para regular la expresión transgénica tanto en células en cultivo como en el cerebro [81-83]. Aunque este sistema ha demostrado ser muy eficiente, tiene varias limitaciones. Dentro de éstas limitaciones se encuentran: 1) La transfección separada de los dos plásmidos disminuye la eficiencia del sistema, ya que eventualmente, no todas

las células blanco de transfección recibirán ambos plásmidos. Teóricamente, este problema podría superarse mediante la introducción de secuencias de ambos plásmidos en un solo vector de expresión, pero el aumento resultante en el tamaño total del DNAp podría obstaculizar el empaquetamiento eficaz en algunos vectores, como se ha reportado anteriormente [84,85]. 2) El uso del promotor del citomegalovirus (pCMV), en el plásmido regulador (pTet-On-Av), aunque induce una fuerte expresión del transgén rtTA-Av, ésta es inespecífica ocurriendo en cualquier tipo celular [86]. Esta limitación, se podría superar sustituyendo el pCMV por un promotor tejido específico. 3) El uso de promotores naturales eucariotes por lo general de gran tamaño molecular, lo que podría exacerbar el problema del tamaño del constructo de DNAp. Esta última limitación se podría superar al utilizar secuencias promotoras mínimas específicas de tejido.

Un trabajo reciente reportó el uso de un vector viral adenoasociado recombinante bicistrónico (rAAV), regulable por tetraciclina (Tet-Off), que ha demostrado ser eficaz en el control de la expresión transgénica de GDNF, en la *substantia nigra* de las ratas normales. Sin embargo, esta estrategia no es práctica para la terapia génica de la EP, ya que requeriría tratamiento indeterminado con tetraciclina para mantener silenciada la expresión del transgén. Además, el vector rAAV carece de un promotor específico de tejido para restringir la expresión transgénica a neuronas dopaminérgica [87], por lo que se podrían esperar consecuencias adversas de la expresión transgénica.

Para superar estos obstáculos, en el presente trabajo se incluyeron dos puntos de control de transcripción en un único plásmido bifuncional que codifica para hGDNF o GFP: 1) La restricción de la expresión transgénica exclusivamente a las neuronas dopaminérgicas utilizando una pequeña construcción de un promotor integrado por tres repeticiones del elemento de respuesta a Nurr1 (NBRE3x), secuencia conocida por contribuir a la especificidad celular de la expresión derivado del promotor del gen del transportador a DA, y 2) la regulación de la expresión de hGDNF usando las secuencias rtTA-Av/TRE, inducible por Dox. Tras la incorporación a las NPs NTS-poliplex, este único plásmido demostró ser inducible por Dox y tener expresión específica en neuronas dopaminérgicas, apoyando su desarrollo como una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la EP. En la Figura 4, se muestra un esquema representativo de la regulación de la expresión génica del sistema bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-Transgén, transfectado en las neuronas dopaminérgicas nigrales.

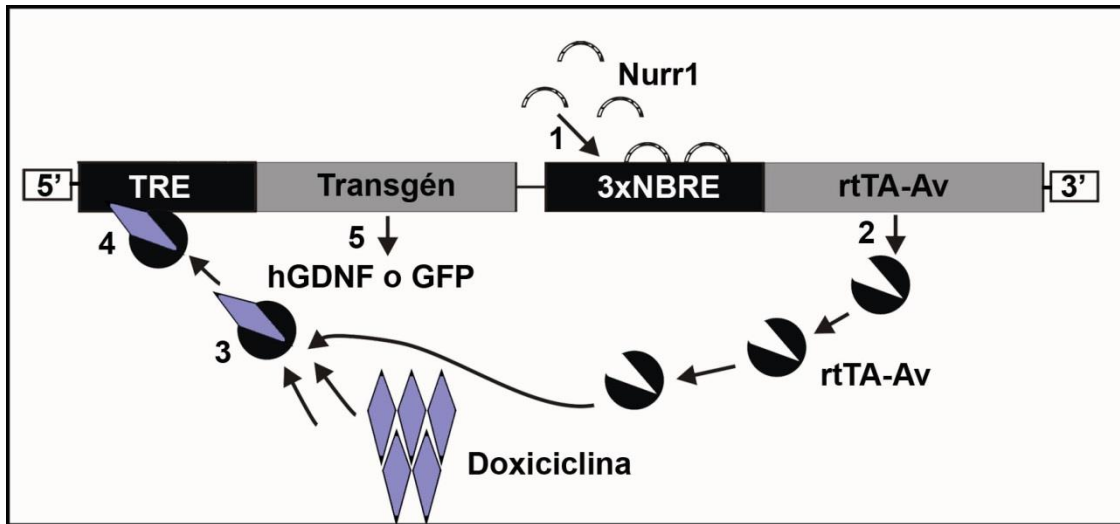


Figura 4. Funcionamiento del sistema regulable bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-transgén específico para neuronas dopaminérgicas nigrales. 1) Nurr1 endógeno se une al promotor NBRE3x y 2) Estimula la expresión del rtTA-Av. En presencia de Dox (rombos grises), 3) Ésta se une al rtTA-Av para formar el complejo rtTA-Av-doxiciclina (Figura 4). Finalmente, 4) Éste complejo se une al elemento de respuesta TRE (que contiene el promotor mínimo de citomegalovirus) y 5) Estimula la transcripción del transgén hGDNF o GFP. En ausencia de doxiciclina, se lleva a cabo la expresión del rtTA-Av pues depende del promotor NBRE3x y Nurr1 endógeno, activo en neuronas dopaminérgicas, pero no se forma el complejo rtTA-Av-doxiciclina, y por lo tanto, no hay estimulación de la transcripción del transgén. El sistema regulable bifuncional es reversible, por lo tanto, la expresión del transgén de interés depende de la presencia de Dox.

1.7 El promotor del transportador de dopamina

El uso del promotor del transportador de dopamina de origen humano (hDAT) en el sistema de NPs de NTS-poliplex, ha conferido el segundo punto de especificidad y la expresión transgénica a largo plazo en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc [44-46].

El transportador de dopamina (DAT) es una proteína de transporte unida a la membrana plasmática, responsable de recapturar a la DA del espacio sináptico para terminar su acción como neurotransmisor [88]. Por lo tanto, el DAT se localiza en la terminal axónica y en las dendritas de las neuronas dopaminérgicas, y su expresión es considerada como un marcador específico del fenotipo dopaminérgico [89]. La población neuronal que sintetiza DA representa solo 1 de cada

10⁶ neuronas centrales que expresan el DAT. Este patrón de expresión tan restringido es controlado por una combinación específica de factores reguladores positivos y negativos [89].

Sacchetti y colaboradores, en el año 1999, caracterizaron la región 5' flanqueante del gen del transportador de dopamina humano (hDAT) [89]. La clonación y el análisis funcional del promotor del gen hDAT, lo ubicó en un fragmento de 8.3 kpb y arrojó nuevas perspectivas sobre los factores de transcripción que intervienen en la regulación de este gen, entre ellas, secuencias de reconocimiento para el factor de transcripción Nurr1.

1.7.1 *El factor de transcripción Nurr1*

El factor de transcripción Nurr1 (Nuclear receptor related-1 protein, por su nombre en el idioma inglés) también es conocido como NR4A2/NOT/TINUR/RNR-1/HZF-3 y junto con los factores de transcripción Nurr77 y NOR-1, constituyen la subfamilia NR4A de receptores nucleares huérfanos [90]. Recientemente se ha sugerido que Nurr1 regula la expresión de la TH, DAT y del transportador monoamínico vesicular tipo 2 (VMAT2) [89,91-94], y que es necesario para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo dopaminérgico de las neuronas mesencefálicas [95], está involucrado en la neurogénesis de los ganglios basales y se expresa en respuesta al daño celular [96]. Además, Nurr1 interactúa con otros factores críticos para la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas [97]. Esto último fue comprobado en ratones carentes de Nurr1, los cuales no desarrollan neuronas dopaminérgicas. Igualmente Nurr1 se encuentra expresado en altos niveles en ratas adultas, aunque su importancia en la modulación fenotípica no es bien conocida [93]. También se ha reportado que Nurr1 promueve la supervivencia de las neuronas DA protegiéndolas contra insultos tóxicos [92].

El promotor DAT cuenta con varios sitios NBRE (elemento de respuesta al factor de crecimiento *B*) a lo largo de la región flanqueante-5', cuya secuencia de 8 pb A/GAAGGTCA/G ha sido identificada como el sitio consenso de unión del factor de transcripción Nurr1. Se han correlacionado los niveles de Nurr1 y la expresión de DAT, observándose un incremento en la expresión del gen luciferasa usado como reportero, bajo el control transcripcional del promotor del gen DAT en presencia de Nurr1 [89].

Estudios post-mortem en humanos han revelado disminución de la expresión de Nurr1 y disminuciones correspondientes de la TH y/o la expresión de DAT durante el curso del envejecimiento normal [98,99] así como en los enfermos de Parkinson [91]. Por lo tanto, Nurr1 sirve como un factor de transcripción específico de neuronas DA cuyas actividades podrían ser reguladas para modular la neurotransmisión dopaminérgica en la EP y otros trastornos.

Interesantemente, se encontró que la secuencia invertida complementaria al sitio canónico NBRE (TGACCTTT) presenta una mayor actividad transcripcional que la secuencia canónica NBRE (GAAGGTCA) cuando es activada por Nurr1 [100]. El Dr. Michael J. Bannon, generó el primer promotor dependiente de Nurr1, utilizando tres secuencias invertidas de NBRE como secuencias regulatorias del promotor mínimo de c-FOS [89,92]. Este promotor se conoce como promotor NBRE3x y es de 253 pb [101]. Recientemente se demostró por primera vez la capacidad del promotor NBRE3x para conducir la expresión de transgenes transfectados con las NPs de NTS-poliplex en neuronas dopaminérgicas de ratas hemiparkinsonianas [101].

2. Planteamiento del problema

Las NPs de NTS-poliplex tienen alta especificidad y eficiencia de transfección, con una alta bioseguridad para el organismo que es transfectado, características que lo hacen un excelente candidato para su utilización en protocolos de terapia génica en humanos [47]. Además, produce expresión prolongada del transgén en neuronas dopaminérgicas nigrales [38,40,46]. Estas características favorecieron el desarrollo de un modelo de terapia neurotrófica con gran potencial para su aplicación en el tratamiento para la EP [9,38,45,56]. En varios modelos animales de la EP, el BDNF [102,103], el Factor de crecimiento de Fibroblastos (b-FGF) [104] y el GDNF [38], ejercen un fuerte efecto de neuroprotección contra diferentes estímulos nocivos. A la fecha, el GDNF se ha usado en protocolos de terapia génica para la EP, debido a su potente efecto neurotrófico sobre las neuronas dopaminérgicas [9,105-107]. Un estudio preclínico reciente, en el que se usaron las NPs de NTS-poliplex ha demostrado que la transferencia de hGDNF causa restauración estructural y funcional de la vía nigroestriatal que se correlaciona con la remisión de los datos clínicos de hemiparkinsonismo [38]. En contraste, niveles altos y sostenidos de la expresión de GDNF, pueden inducir invasión aberrante del sistema nigroestriatal [57] y disminución de los marcadores del fenotipo dopaminérgico [58,108], lo que indica que los efectos a largo plazo de la sobre-expresión sostenida de GDNF podrían superar los beneficios. Para maximizar los beneficios potenciales en la terapia génica con GDNF, probablemente se requiera regular la expresión del gen [68,69,108]. Para este fin, nos propusimos construir NPs de NTS-poliplex que contenga a un plásmido bifuncional regulable que codifique para hGDNF de forma tejida específica.

3. Hipótesis

La transferencia del plásmido bifuncional regulable de hGDNF a neuronas dopaminérgicas nigrales mediante las NPs de NTS-poliplex ocasionará la expresión del transactivador reverso a tetraciclina avanzado (rtTA-Av) de manera tejido-específica lo que subsecuentemente inducirá la expresión de hGDNF, de forma dependiente de la administración de doxiciclina.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Demostrar la expresión regulada y tejido-específica del gen hGDNF, transferido por las NPs de NTS-poliplex, en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de ratas sanas.

4.2 Objetivos particulares

1. Construir plásmidos bifuncionales (pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF y pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP), que codifiquen para hGDNF o para GFP.
2. Construir y caracterizar las NPs de NTS-poliplex que contengan el plásmido bifuncional que codifica para hGDNF o para GFP.
3. Demostrar que el promotor NBRE3x dirige la expresión de los transgenes hGDNF y GFP en cultivos de células N1E-115, transfectadas previamente con el gen que codifica para Nurr1.
4. Demostrar que el promotor NBRE3x dirige la expresión de los transgenes hGDNF y GFP en la SNpc de ratas.
5. Demostrar que la administración de doxiciclina induce la expresión de GFP y hGDNF *in vitro* en cultivos de células N1E-115-Nurr1 transfectadas con los plásmidos bifuncionales.
6. Demostrar que la administración de doxiciclina induce la expresión de GFP en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc de ratas transfectadas con los plásmidos bifuncionales.
7. Demostrar que la administración de doxiciclina a ratas previamente transfectadas con el sistema de NPs de NTS-poliplex es capaz de activar de forma específica la transcripción del plásmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF permitiendo la expresión tejido específica del hGDNF en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc

5. Materiales y métodos

5.1 Cultivos celulares y animales

Todos los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo en la línea celular N1E-115, de neuroblastoma murino, y fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EE.UU). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, sin piruvato de sodio) suplementado con 10 % de Suero Bovino Fetal (SBF), 20 mM de GlutamaxTM-1, penicilina-estreptomina (100 µg/mL de cada uno) o G-418 (200 µg/mL), usado como antibiótico de selección; todos los reactivos fueron obtenidos de Gibco, Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EE.UU). Los cultivos fueron mantenidos a 37 °C bajo una atmosfera de 5 % de CO₂.

Todos los experimentos *in vivo* fueron realizados en ratas adultas machos de la cepa Wistar (220 ± 10 gr de peso), las cuales fueron criadas y suministradas por la Unidad de Producción de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV). Durante los experimentos, los animales fueron mantenidos en la Unidad de Experimentación bajo condiciones controladas de temperatura constante (23 °C) y ciclos de luz/oscuridad de 12:12 horas, con agua y alimento a satisfacción. Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio del CINVESTAV (autorización no. 162-15) certificados por la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA; NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-ECOL-1995). Se realizaron todos los esfuerzos posibles para disminuir el sufrimiento y el número de los animales utilizados en este trabajo.

5.2 Plásmidos

Para construir los plásmidos utilizados en este proyecto, se utilizaron varios “kits” comerciales de biología molecular. Las purificaciones de las secuencias de DNAp de interés se realizaron utilizando el kit de extracción en gel “QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen; Turnberry Line, CA, EE.UU). En todos los casos, las secuencias purificadas fueron cuantificadas mediante el uso de un espectrofotómetro digital (Nanodrop, ND-1000, Termo científico; Wilmington, DE, EE.UU). La desfosforilación de éstas, se realizó con la enzima CIP, Fosfatasa alcalina, (New England Biolabs; Ipswich, MA, EE.UU). La ligación de las secuencias se realizó por medio del kit “Rapid DNA Ligation” (Termo científico; Wilmington, DE, EE.UU). Las clonas positivas (clonas transformadas) se amplificaron por midiprep (Qiagen; Turnberry Line, CA, EE.UU). La identificación de los plásmidos nuevos se realizó mediante ensayos de digestión enzimática. El Laboratorio de Secuenciación de FES-Iztacala, UNAM, determinó la exactitud de las secuencias clonadas, utilizando secuenciación automática del DNAp en un analizador genético modelo 3130XL (Applied Biosystems; Grand Island, NY, EE.UU).

5.2.1 Construcción del plásmido pNBRE3x-GFP

Para construir el plásmido pNBRE3x-GFP se utilizó el pGL2-Basic-NBRE3x-Luc, como plásmido receptor, (que codifica para Luciferasa, donado por el Dr. Michael J. Bannon), el cual se sustituyó el gen Luc por el gen EGFP (GFP) obtenido del pEGFP-N1, plásmido donador (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU). El gen de luciferasa se exindió por restricción utilizando las enzimas *HindIII* y *PfmI*, resultando un fragmento de 1990 pb. El gen EGFP se aisló por restricción utilizando las enzimas *HindIII* y *NotI*, resultando un fragmento de 779 pb. Los fragmentos cortados con las enzimas *NotI* y *Pfml* se repararon con Klenow para obtener extremos parejos. El fragmento de 779 pb que contiene la secuencia codificante para EGFP se ligó al plásmido pGL2-basic-NBRE3x, resultando del pNBRE3x-GFP de un tamaño de 4635 pb.

5.2.2 *Contrucción del plásmido pNBRE3x-hGDNF*

Para construir el plásmido pNBRE3x-hGDNF se utilizó el pGL2-Basic-NBRE3x-hGDNF-antisentido, como plásmido receptor. La secuencia codificante del gen hGDNF-antisentido se exindió por restricción con las enzimas *XbaI* y *EcoRV*, generando un fragmento de 3855 pb. La secuencia codificante del gen hGDNF se aisló del pTRE-Tight-hGDNF-antisentido por restricción usando las enzimas *XbaI* y *SmaI*, generando un fragmento de 747 pb. Los extremos generados por la enzima *XbaI* del fragmento de 747 pb fueron compatibles y los extremos generados con las enzimas *EcoRV* y *SmaI* generaron extremos parejos y se ligaron, generando el pNBRE3x-hGDNF de 4592 pb.

5.2.3 *Construcción del plásmido pNBRE3x-Tet-On-Avanzado*

Para construir el plásmido pNBRE3x-Tet-On-Av se utilizó el pTet-On-Av, como plásmido receptor, (que contiene el promotor CMV) el cual se sustituyó por la secuencia promotora NBRE3x, que fue obtenido del pNBRE3x-Tet-On, plásmido donador. El promotor NBRE3x se aisló por restricción utilizando las enzimas *NheI* y *EcoRI*, resultando un fragmento de 1036 pb. El promotor CMV del pTet-On-Av se exindió por restricción utilizando las enzimas *NheI* y *EcoRV*, resultado de un fragmento de 5788 pb. El fragmento de 1036 pb que contiene la secuencia promotora NBRE3x se ligó al fragmento de 5788 pb, resultando del pNBRE3x-Tet-On-Av de un tamaño de 7403 pb.

5.2.4 *Construcción del plásmido pTRE-Tight-EGFP*

Para construir el plásmido pTRE-Tight-EGFP se utilizó el pTRE-Tight como plásmido receptor y se insertó la secuencia codificante para EGFP obtenido del pEGFP-N1, plásmido donador. El gen EGFP se aisló por restricción utilizando las enzimas *BamHI* y *NotI*, resultando un fragmento de 741 pb el cual se ligó en el sitio multiple de clonación del pTRE-Tight, resultando del pTRE-Tight-EGFP de un plásmido de 3315 pb.

5.2.5 Construcción del plásmido *pTRE-Tight-hGDNF*

Para construir el plásmido *pTRE-Tight-hGDNF*, se utilizó el *pTRE-Tight-hGDNF*-antisentido, plásmido donador y el *pTRE-Tight*, plásmido receptor. La secuencia codificante del gen *hGDNF* del *pTRE-Tight-hGDNF*-antisentido se obtuvo por restricción usando las enzimas *EcoRV* y *HindIII*, resultado un fragmento de 686 pb. El plásmido receptor *pTRE-Tight* se cortó con las enzimas *SmaI* y *HindIII*. Las enzimas *SmaI* y *HindIII* generan extremos parejos por lo que el fragmento de 686 pb que contiene el gen *hGDNF* se ligó al sitio múltiple de clonación del *pTRE-Tight*, resultando del *pTRE-Tight-hGDNF* de un tamaño de 3235 pb.

5.2.6 Construcción del plásmido *pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP*

Para construir el plásmido *pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP* se utilizaron los plásmidos *pNBRE3x-Tet-On-Av* y *pTRE-Tight-EGFP*, (plásmido receptor y donador, respectivamente), se digirieron con la enzima de restricción *XhoI*. Se obtuvo un fragmento de 1310 pb que contiene la secuencia *Tight-EGFP* del *pTRE-Tight-EGFP*. Los fragmentos fueron cuantificados y se ligaron. Para identificar las posibles clonas, se realizaron PCR de colonia, utilizando los primers específicos para *EGFP* (ver tabla 3). Las clonas positivas se amplificaron por midiprep y se realizó ensayos de restricción con la enzima *XbaI*, para determinar las variantes del plásmido *pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP*, que resultó de un tamaño de 5309 pb.

5.2.7 Construcción del plásmido *pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF*

Para construir el plásmido *pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF* se utilizaron los plásmidos *pNBRE3x-Tet-On-Av* y *pTRE-Tight-EGFP*, (plasmido receptor y donador, respectivamente). Ambos plásmidos se digirieron con la enzima de restricción *XhoI*. Se obtuvo un fragmento de 1230 pb que contiene la secuencia *Tight-hGDNF* del *pTRE-Tight-hGDNF*. El *pNBRE3x-Tet-On-Av* digerido con *XhoI*. Para identificar las posibles clonas, se realizó PCR de colonia con los primers específicos para *hGDNF* (ver tabla 2). Las clonas positivas se amplificaron con midiprep y se digirieron con la enzima *HindIII*, para determinar las variantes del plásmido *pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF*, que resultó de un tamaño de 5229 pb.

5.3 Amplificación y purificación de los plásmidos

Se transformaron bacterias competentes de la cepa DH5 α de *Escherichia coli* por choque térmico con los plásmidos de interés. De manera breve, y para cada plásmido de interés, se prepararon diluciones de 100 ng/ μ L de DNAP en agua. Posteriormente, se mezcló 1 μ L de la dilución de DNAP con 75 μ L de suspensión celular. Inmediatamente, se procedió a incubar dicha mezcla en hielo durante 30 minutos, y después a 42 °C por 90 segundos. Enseguida, se mezcló con 900 μ L de medio de cultivo Luria Bertani (LB), en ausencia de antibiótico y se agitó durante 1.5 h a 37 °C a 200 r.p.m. Para seleccionar a las colonias bacterianas, se inocularon 100 μ L de cultivo bacteriano en cajas de petri (conteniendo medio LB con ampicilina o kanamicina (100 μ g/ μ L), según el plásmido) por estría cruzada y se incubaron a 37°C durante 8 horas. Posteriormente, se tomó una colonia y se inoculó en medio LB líquido incubándose a 37 °C, en agitación constante a 200 r.p.m durante 8 horas. Finalizado este periodo, se tomó 1 ml del medio bacteriano y se inoculó en 2.5 L de medio LB líquido, para plásmidos de bajo número de copias, y 0.5 L para plásmidos de alto número de copias. El inóculo se mantuvo en agitación oscilante a 200 r.p.m durante 16 horas. Se obtuvo la biomasa por centrifugación a 6000 x g a 4 °C durante 15 minutos, desechando el sobrenadante. Para la purificación de los plásmidos se utilizó el kit EndoFree Plasmid Purification de QIAGEN[®], (Hilden, Alemania). Siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.4 Síntesis del acarreador de neurotensina: NTS-PLL-PF

La síntesis del nanovector génico, Neurotensina-Polilisina-Péptido Fusogénico (NTS-PLL-PF), se realizó en 5 etapas secuenciales, como lo describió Navarro-Quiroga [40]. De manera breve, se describen los pasos de la síntesis del acarreador de NTS.

- Etapas 1.- Síntesis del conjugado PLL-SPDP.
- Etapas 2.- Síntesis del conjugado PLL-SPDP-SH.
- Etapas 3.- Síntesis del conjugado NTS-SPDP.
- Etapas 4.- Síntesis del conjugado PF-SPDP.
- Etapas 5.- Síntesis del conjugado NTS-PLL-PF.

5.4.1 Formación del conjugado PLL-SPDP y PLL-SPDP-SH

Se disolvieron 25 mg de poli-L-lisina hidroclicada (PLL; 50,000 Da; Sigma, St. Louis, MO, EE.UU) en 2 mL de PBS para cromatografía (17.42 mM Na₂HPO₄, 2.58 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, pH 7.2). En un tubo aparte, se disolvieron 7.8 mg del entrecruzador bifuncional N-succinimidil 6-3[3-(2-piridilditio) propionamida]-hexanoato (LC-SPDP; masa molecular; 472.52, Pierce Chemical Co, Rockford, IL, EE.UU) en 31.2 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, ambas diluciones se mezclaron por agitación rápida y vigorosa (1000-1500 r.p.m.), para evitar la formación de precipitados, la mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente (TA) y en la oscuridad (SPDP es sensible a la luz). El conjugado resultante, PLL-SPDP, se purificó en una columna Econo-Pac 10DG (Bio-Rad laboratorios; Hercules, CA, EE.UU) previamente equilibrado con PBS para cromatografía a TA. Luego, se colectaron 22 fracciones de 1 mL cada una, a cada alícuota se le determinó la absorbancia a 220 y 280 nm en el espectrómetro Nanodrop ND1000 en la modalidad “AB280 protein”. Se obtuvo el cromatograma graficando la absorbancia contra el volumen de elución. Se juntaron las fracciones de 3 a 7, donde eluye el primer pico, el cual contiene la fracción PLL-SPDP, y se redujeron a un volumen de 1 mL utilizando un concentrador al vacío (Heto Lab Equipment of Denmark). En un tubo aparte, se disolvió 24 mg de ditiotreitól (DTT, Sigma) en 0.5 mL de PBS para cromatografía y rápidamente, se mezcló con el conjugado PLL-SPDP (1 mL), la mezcla se agitó en un vortex de 1000-1500 r.p.m. durante 30 minutos a TA y protegido de la luz. Al finalizar la incubación, una alícuota de la mezcla de reacción se diluyó 1:100 y 1:200 en PBS para cromatografía y se leyó a 343 nm en un espectrofotómetro Beckman. La eficiencia de la reacción se determinó basándose en la concentración de la piridina-2-tiona utilizando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{\text{Abs}_{343 \text{ nm}}}{\text{E}_{343 \text{ nm}}} \text{ FD}$$

Donde:

C = concentración de la piridina-2-tiona

Abs_{343nm} = Absorbancia de la pirimidina-2-tiona a 343 nm

E_{343nm} = coeficiente de extinción molar a 343 nm (8.08 x 10³ cm⁻¹ M⁻¹)

FD = factor de dilución.

Así, la eficiencia de la reacción se determinó con la siguiente ecuación:

$$E = \frac{C}{[\text{SPDP}]_i} 100\%$$

Donde:

E = Eficiencia de la reacción

C = Concentración de piridina-2-tiona

[SPDP]_i = Concentración inicial de SPDP

La fracción del conjugado PLL-SPDP-SH se purificó en una columna Econo-Pac 10DG. Se recolectaron 22 fracciones de 1 ml y se leyó la DO a 220 y 280 nm en el NanoDrop. Posteriormente, se tomaron las fracciones de la 3 a la 7, se juntaron y se concentraron en 0.8 ml con la ayuda del concentrador al vacío.

5.4.2 *Formación del conjugado NTS-SPDP*

Se disolvieron 10 mg de NTS (ELYENKPRRPYIL; peso molecular: 1672 Da, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU) en 2 mL de PBS para cromatografía. En otro tubo, se disolvieron 5.6 mg de LC-SPDP en 30 μ L de DMSO, rápidamente ambas soluciones se mezclaron vigorosamente en un vortex (1000-1500 r.p.m) durante 30 min a TA, y protegido de la luz, para evitar la formación de precipitados. Finalizada la incubación, el conjugado NTS-SPDP se purificó en una columna de Sephadex G10 (GE-Healthcare Bio Sciences AB) previamente equilibrada con PBS para cromatografía a TA. Luego, se recolectaron 130 fracciones de 0.1 mL, y se determinó la absorbancia a 220 y 280 nm en el Nanodrop, en la modalidad “UV-Vis”. Se obtuvo el cromatograma graficando la absorbancia contra el volumen de elución. Se juntaron las fracciones donde eluyó el primer pico (fracciones 50 al 100), se juntaron y se concentró a un volumen a 0.8 mL utilizando un microconcentrador al vacío. El primer pico contiene la fracción NTS-SPDP.

5.4.3 *Formación del conjugado PF-SPDP*

Se disolvieron 8.1 mg de péptido fusogénico (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCAKKK; SynBioSci) en 2 mL de PBS para cromatografía. En otro tubo, se disolvieron 2.4 mg de LC-SPSP en 28.8 μ L de DMSO. Ambas soluciones se mezclaron rápidamente en un vortex a una velocidad de 1000-1500 r.p.m., durante 30 minutos a TA y protegido de la luz, para evitar la formación de precipitados. Finalizado este periodo de incubación, la mezcla de reacción se purificó por cromatografía de exclusión molecular en resina Sephadex G-15 (GE-Healthcare Bio Science AB), previamente equilibrada con PBS para cromatografía. Se leyó la absorbancia a 220 y 280 nm en el NanoDrop, y se colectaron 150 fracciones de 0.1 mL. Se obtuvo el cromatograma graficando la absorbancia contra el volumen de elución. Se juntaron las fracciones donde eluye el primer pico (43 al 135), se juntaron y se concentraron a un volumen de 0.8 mL utilizando un concentrador al vacío. El primer pico contiene la fracción PF-SPDP.

5.4.4 *Formación del conjugado NTS-PLL-PF*

En un tubo de ensayo de 5 ml estéril, se mezclaron los volúmenes correspondientes a las fracciones de NTS-SPDP y PF-SPDP en un vortex e inmediatamente después, se agregó la fracción del complejo PLL-SPDP-SH y se agitó vigorosamente en un vortex, protegido de la luz durante 12 h a TA. Al término de la incubación, se hizo una dilución 1:50 en PBS para cromatografía y se leyó la absorbancia a 343 nm para determinar la eficiencia de la reacción basándose en la concentración de la piridina-2-tiona liberada durante la conjugación. El conjugado NTS-PLL-PF, se purificó por cromatografía de exclusión molecular en resina Biogel A-15m (Bio-Rad laboratories; Hercules, CA, EE.UU) previamente equilibrada con 2 M guanidina en 10 mM de HEPES, pH 7.4. Se recolectaron 110 fracciones de 1 mL. Se diluyeron 100 μ L de cada fracción con 200 μ L de PBS para cromatografía y se determinó la absorbancia simultáneamente a 215, 280 y 343 nm, en un espectrofotómetro Beckman. Se obtuvo el cromatograma de purificación considerando las tres longitudes de onda. Se juntaron las fracciones en donde eluyen conjugados de peso molecular en el rango de 66,000 a 200,000 Da y se redujo el volumen a 1 mL utilizando una cámara de ultrafiltración bajo atmósfera de N₂ modelo 12 (Amicon Corporation; Lexington, MA, EE.UU), usando una membrana Millipore de 30,000 Da. Se llevó a cabo la diálisis de la solución que contiene el conjugado NTS-PLL-PF, usando una membrana de diálisis de celulosa regenerada de la marca Fisherbrand® de 12,000-14,000 Da de exclusión molecular, en 2 L de PBS

para células (8.1 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4) durante 12 h. El proceso de diálisis se repitió cinco veces utilizando en cada cambio PBS para células fresco. Finalmente la solución que contiene la NTS-PLL-PF se esterilizó por filtración en membrana hidrofílica de 0.22 μm, y enseguida se alicuotó en volúmenes de 10 y 20 μL, y se almacenaron a - 70 °C. La concentración de PLL en el conjugado se calculó en base a una curva estándar de PLL (50,000 Da) graficando la absorbancia a 215 nm contra la concentración (0.1 a 1.0 mg/mL in PBS para células). Se leyó la absorbancia a 215 nm de muestras diluidas del conjugado NTS-PLL-PF y se interpolaron los valores en la curva estándar, los cuales se corrigieron por el factor de dilución para calcular la concentración de PLL en el conjugado (mg/mL). La concentración molar del conjugado se obtuvo por la división de la concentración de PLL en el conjugado (mg/mL) entre el peso molecular promedio del conjugado.

5.4.5 *Formación del sistema de nanopartículas de NTS-poliplex*

La formación de las NPs de NTS-poliplex involucra dos reacciones electrostáticas consecutivas de 30 minutos de duración cada una [40]. En la primera reacción, el péptido cariofílico (PK) se acopla electrostáticamente al ADN plasmídico para formar el complejo ADNp-PK. En la segunda reacción, el NTS-acarreador se acopla al complejo ADNp-PK para formar las nanopartículas de NTS-poliplex. Las concentraciones molares óptimas (CMO) de los reactantes se pueden predecir por los ensayos de retardo electroforético, que permite seleccionar la concentración molar óptima de la formación del complejo ADNp-PK, y el ensayo de retención electroforética, que permite seleccionar la concentración molar óptima del NTS-acarreador acoplado al complejo ADNp-PK.

Trabajos previos han correlacionado el patrón de migración con la eficiencia de transfección que ha servido de base para establecer el criterio para seleccionar las concentraciones molares que proporcionen la eficiencia de transfección más alta, a las cuales se les ha denominado concentraciones molares óptimas [46]. Se utilizó el péptido de 20 aminoácidos de la proteína de direccionamiento nuclear Vp1 del virus SV40 (PK; MAPTKRKGSCPGAAPNKPK; 90 % purity; Synpep Corp; Dublin, CA, EE.UU).

5.4.5.1 Acople electrostático entre el DNAp y el PK

Se utilizó el criterio de los microensayos de retardo en gel de agarosa, para determinar las CMO de la formación del complejo DNAp-PK. Alícuotas de concentraciones crecientes del PK (0 - 12 μM con un Δ de 1 μM) fueron agregadas a alícuotas de 6 nM de DNAp; las mezclas fueron incubadas en agitación a una velocidad de 1000 r.p.m durante 30 min. Al término de la incubación, los conjugados formados a cada relación molar fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, a 80 voltios, durante 45 minutos en buffer de corrida TAE (Tris-base 40mM, Acido acético Glacial 40 mM, EDTA 1 mM). Las bandas de DNAp se tiñeron con bromuro de etidio y fueron fotodocumentadas y digitalizadas en un transluminador de luz UV. Se determinó que la relación molar óptima de la formación del conjugado DNAp-PK fuera aquella que retarde su corrimiento electroforético por encima del DNAp del control.

5.4.5.2 Acople electrostático entre el acarreador de NTS y el DNAp-PK

Se utilizó el criterio de los microensayos de retención electroforética en geles de agarosa para determinar las relaciones óptimas de la formación del NTS-poliplex con el vector fusogénico de neurotensina y el complejo DNAp-PK. Brevemente, a la relación molar óptima del conjugado DNAp-PK obtenida como se describió en el apartado anterior, se le añadió lentamente el complejo NTS-PLL-PF a concentraciones crecientes (0 – 216 nM con un Δ de 18 nM). La mezcla de reacción se incubó en agitación a una velocidad de 1000 r.p.m durante 30 min. Al término de la incubación, los poliplexes formados a cada relación molar fueron sometidos a las mismas condiciones de electroforesis y tinción que el apartado anterior. Se determinó que la relación molar óptima de la formación del NTS-poliplex fuera aquella que retuviera la totalidad del DNAp en el pozo del gel.

5.5 Propiedades físicas de las nanopartículas de NTS-poliplex

5.5.1 Microscopía electrónica de barrido

El tamaño de las NPs de NTS-poliplex se midió usando la tecnología de Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (SEM, Zeiss modelo, Auriga-39-16). Las muestras de NPs de NTS-polplex se colocaron en un portaespecimen de cobre, adherida a una cinta de doble cara # 5085 SPI-AB-Cu. Las muestras se secaron en una cámara de vacío (Secador™ 1.0 gabinete desecador, Bel-Art Products; Wayne, NJ, EE.UU.) durante 24 horas a TA. Las nanografías se tomaron en el Laboratorio Avanzado de Electron Nanoscopia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

5.5.2 Determinación del tamaño de partícula y potencial zeta.

El diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las NPs de NTS-poliplex se midieron por la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) usando el analizador de tamaño Zetasizer, modelo Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Además, se utilizó el kit “Malvern Dip Cell”, modelo ZEN1002, para la medición del Potencial Zeta. Las muestras de NPs de NTS-polyplex fueron construidas como se indicó en la Tabla 2, utilizando agua grado biología molecular (18 mΩ) como un vehículo y diluido a 1 mL en agua ultra-limpia a 18 mΩ.

5.6 Transfecciones

5.6.1 In vitro

Se utilizó la línea celular de neuroblastoma murino N1E-115 para obtener una línea celular que exprese altos niveles de Nurr1 (N1E-115-Nurr1) y para determinar la funcionalidad de los plásmidos del sistema regulable original (que contiene el promotor CMV), así como los plásmidos bifuncionales del sistema regulable (que contiene el promotor NBRE3x, el promotor TRE y el gen de interés).

5.6.1.1 Transfección del plásmido pCMV-Script-Nurr1 en células N1E-115 (obtención de la clona N1E-115-Nurr1)

Con el objetivo de contar con una línea celular que exprese altos niveles de Nurr1, se procedió a transfectar células N1E-115 con el pCMV-Script-Nurr1, que codifica para el factor de transcripción Nurr1, (donado por el Dr. Michael J. Bannon), mediante Lipofectamina 2000 (Invitrogen life Technologies. U.S.A), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó G-418 como antibiótico de selección. De manera breve se describe como se obtuvo la clona N1E-115-Nurr1: Se sembraron 25,000 células en 4 pozos de cultivo de 2 cm² (en medio DMEM suplementado, ver siguiente apartado), dos pozos controles; (control 1, sin antibiótico y sin transfectar; control 2, con antibiótico y sin transfectar) y dos pozos experimentales transfectados. Las células control 2 y los dos pozos experimentales se cultivaron en presencia de 200 µg/mL de G-418. Cada 24 horas se realizaron cambios de medio a cada pozo (control 2 y experimentales) a razón de 200 µg/mL de G-418. Después de 7 días de cultivo, las células experimentales y el control 2 alcanzaron una concentración de 1400 µg/mL de G-418, a esta concentración de antibiótico las células control 2 se murieron. Posteriormente, las células experimentales que contenían altas concentraciones de antibiótico se amplificaron en presencia de G-418 a una concentración de mantenimiento de 200 µg/mL. Una vez obtenida la clona celular N1E-115-Nurr1 se procedió a realizar los experimentos de transfección con los plásmidos de interés.

5.6.1.2 Determinación de las concentraciones molares óptimas del complejo DNAP-PK

La mutante de la proteína Vp1 del virus SV40 (MAPTKRKGSCPGAAPNKPK) fue sintetizada por (Synpep Corp; Dublín, CA, EE.UU) con una pureza del 97 %. La carga neta positiva del PK permite su unión electrostática al DNAP (polianión) para formar el complejo DNAP-PK. Tanto el DNAP como el PK se diluyeron con medio DMEM libre de suero. Para determinar la concentración molar entre el DNAP y el PK que produjera polifecciones eficientes, se incubaron concentraciones constantes de DNAP (6 nM, concentración final) con concentraciones crecientes del PK (1-11 µM con un Δ de 1 µM, concentraciones finales) durante 30 minutos a TA y en agitación constante. Al final de la incubación las diferentes mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, a 80 V por 45 minutos, el patrón de corrimiento

electróforético del DNAp se reveló con bromuro de etidio (10 µg/ml en TAE). Se seleccionó la primera relación que mostró un claro retardo electroforético con respecto al DNAp control (sin PK). Esta relación se conoce como la relación óptima del DNAp-PK según lo establecieron nuestros trabajos previos [38,40,46]. Las bandas fueron fotografiadas en un fotodocumentador BioDoc-It Imaging System (UVP; Upland, Canada).

5.6.1.3 Construcción de las nanopartículas de NTS-poliplex

5.6.1.3.1 Determinación de las concentraciones molares óptimas del complejo DNAp-PK- acarreador de NTS

Como se ha mencionado anteriormente, las NPs de NTS-poliplex se construyen por la unión electrostática de: 1) DNAp, 2) PK y 3) NTS-acarreador. Para construir NPs de NTS-poliplex de buena calidad, que produzca transfecciones altamente eficientes, es necesario determinar la concentración molar óptima de sus componentes. Posterior a la determinación de la concentración molar óptima del complejo DNAp-PK (como se describió en el apartado anterior), se procede a determinar la concentración molar óptima del NTS-acarreador, que se une al complejo DNAp-PK, como se describe a continuación: Se incubaron alícuotas constantes de 6 nM de DNAp con el PK (a la concentración óptima determinada previamente, para cada plásmidos en estudio). Después de 30 min de incubación, en agitación orbital a 1000 r.p.m, se mezclaron con concentraciones crecientes del NTS-acarreador (216 nM, 234 nM, 252 nM y 270 nM). La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos adicionales en agitación orbital continua a 1000 r.p.m. Al finalizar la segunda incubación, las mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, a 80 V por 45 minutos y el patrón de corrimiento electroforético del DNAp se reveló con bromuro de etidio (10 µg/ml en TAE). Se seleccionó la primera concentración molar, del NTS-acarreador, que mostró una clara retención del corrimiento electroforético del DNAp. Esta relación se conoce como la concentración molar óptima del complejo DNAp-PK-NTS-acarreador, según lo establecieron nuestros trabajos previos [38,40,46]. Las bandas fueron fotodocumentadas en un fotodocumentador BioDoc-It Imaging System (UVP; Upland, Canada). Todos los procedimientos se realizaron a TA. Sólo en los ensayos de transfección *in vitro*, se adicionó 1 % de SBF, después de formar el complejo DNAp-PK, con la finalidad de lograr la compactación total del DNAp.

5.6.1.3.2 *Transfección de los plásmidos del sistema regulable mediante las nanopartículas de NTS- poliplex*

Los ensayos de transfección se realizaron en la clona celular N1E-115-Nurr1. Las células fueron transfectadas a una confluencia de 50 % en pozos de 1 cm² partiendo de una cantidad inicial de 50,000 células. En este punto se transfectaron con los plásmidos control y los que conforman el sistema regulable e inmediatamente se adicionó Doxiciclina (Dox +, grupos control positivo de la expresión del transgén). Después de 24 horas de transfección, el medio se diluyó 1:2 con medio fresco suplementado y las células se incubaron por un periodo adicional de 48 h (periodo de expresión). La Dox se adicionó al medio de cultivo cada 24 h a una concentración final de 100 ng/mL. Los experimentos control negativo, se realizaron en ausencia de Dox (Dox -). Al finalizar este tiempo, las células se lavaron con PBS para ser fijadas con PFA (paraformaldehído) al 4 % durante 10 minutos, y montadas en portaobjetos para fluorescencia o para proceder a la detección de la proteína de interés, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

5.6.1.4 *Ensayos de doble inmunofluorescencia indirecta*

Las células N1E-115-Nurr1 fueron transfectadas como se menciona anteriormente. Brevemente se describe como se llevo a cabo los ensayos de doble inmunofluorencia: Primero, las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS por 10 minutos. Luego se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos. Se procedió a permeabilizar con una solución de PBS-Triton al 0.1% 3 veces durante 10 minutos. Enseguida, se procedió a bloquear con suero normal de cabra o de caballo al 10% disuelto en PBS-Triton al 0.1% durante 30 minutos a TA. Después, las células se lavaron 3 veces con una solución de PBS-Triton al 0.025% durante 5 minutos. Posteriormente, se procedió a incubar con los anticuerpos primarios a 4 °C durante 24 horas: anti-Nurr1 hecho en conejo (1/200; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, EE.UU), anti-hGDNF hecho en cabra (1:500; Abcam; Cambridge, MA, RU), anti-Golgin 97 hecho en ratón (1/200, Molecular Probes; Grand Island, NY, EE.UU). Después del tiempo de incubación con los anticuerpos primarios, las células se lavaron 3 veces con PBS-Triton al 0.025% durante 5 minutos y finalmente, se procedió a incubar con los anticuerpos secundarios durante 2 horas a TA protegido de la luz: anti-conejo alexa 488 hecho en pollo (1/200; Invitrogen; Grand Island, NY, EE.UU), anti-cabra alexa 488 hecho en burro (1/200; Invitrogen; Grand Island, NY, EE.UU), anti-conejo Texas red hecho en caballo (1:400; Vector Laboratories; Burlingame,

CA, EE.UU), anti-ratón Texas Red hecho en caballo (1/200; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE.UU). Después de este periodo de incubación, las células se lavaron con PBS-Triton al 0.025% durante 5 minutos y posteriormente, los núcleos se tiñeron con una solución 1 mM de Hoescht 33258 en PBS durante 5 minutos y finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS, se dejaron secar a TA y los cubre objetos se montaron sobre portaobjetos para fluorescencia con Vectahield (Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE.UU). La fluorescencia de los tejidos se analizaron con el objetivo 63X del microscopio Leica DMIRE2 (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany), usando los siguientes filtros: K3 para la alexa 488 y TX2 para Texas Red y A para Hoescht.

5.6.2 *In vivo*

Antes de llevar a cabo los ensayos de transfección *in vivo*, se procedió a estandarizar el sitio de inyección en la SNpc de rata sana.

5.6.2.1 Sitio de inyección en la substantia nigra pars compacta de rata

Para estandarizar el sitio de inyección en la SNpc, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 210-230 g de peso corporal, las cuales fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina-xylazina (120 mg/kg: 9mg/kg) y fijadas a un aparato estereotáxico. Después de la trepanación, se procedió a inyectar fucsina intracraneal, en las coordenadas: AP + 2.5 mm, ML + 2.0 mm, DV - 6.7 de la dura madre. Diez minutos posteriores a la inyección del colorante, la rata fue perfundida con PFA al 4 % y el cerebro fue incluido en sacarosa al 30 % por 3 días. Posteriormente, se obtuvieron cortes coronales mesencefálicos 30 µm de espesor. Los cortes obtenidos fueron teñidos con violeta de cresilo y montados en portaobjetos.

5.6.2.2 *Transfección de las neuronas dopaminérgicas de la substantia nigra pars compacta de rata*

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, como se describió en el apartado anterior. Después de la trepanación, se inyectaron 2 μ L de la solución de NPs de NTS-poliplex (conteniendo el plásmido en cuestión) a un flujo de 10 μ L/h, en la SNpc del lado izquierdo. Las coordenadas fueron: AP, + 2.5 mm; ML, + 2.1 mm de la línea interaural; DV, - 6.7 de la dura madre. Las concentraciones usadas para transfectar los diferentes plásmidos se muestran en la tabla 1. Después de la cirugía los animales fueron puestos en sus cajas con agua y comida *at libitum* y mantenidas en ciclo de luz/obscuridad de 12:12 h.

5.6.2.3 *Ensayos de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)*

En los ensayos de RT-PCR, se extrajo RNA (ácido ribonucleico, por sus siglas en inglés) total utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA, EE.UU). Mediante éste ensayo, se mostró la expresión del RNAm (RNA mensajero) del EGFP, hGDNF y el rtTA en la SNpc y ST de rata y fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm y analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El RNA total fue disuelto en agua libre de RNAsas para conservar su integridad. El RNA total fue transcrito con la transcriptasa reversa SuperScript III (200 U) usando 0.1 μ g de oligo-dT (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA, U EE.UU). EL cDNA sintetizado fue amplificado en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems; Foster city, CA, EE.UU) usando 1 nmol de cada oligo sentido y anti-sentido y 1.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen Life Technologies; San Diego, CA, EE.UU) a un volumen final de 25 μ L. Se utilizó PCR de punto final para amplificar el EGFP, hGDNF, rtTA-Av, Nurr1 y Actina, en la SN completa y ST. Se amplificó un fragmento de 649 pb del EGFP (ver tabla 3), un fragmento de 555 pb correspondiente al hGDNF, un fragmento de 401 pb correspondiente al rtTA, un fragmento de 565 pb correspondiente a Nurr1 y un fragmento de 213 pb correspondiente a la actina (control de carga). Después del paso de desnaturalización a 94°C durante 5 min, la amplificación se realizó con 35 ciclos para los cinco transcritos, la temperatura de alineamiento utilizada se muestra en la tabla 1. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio y fotografiado en un fotodocumentador BioDoc-It Imaging System (UVP; Upland, Canada).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los transcritos de interés

Oligonucleótido	Ta (°C), duración (s)	Te (°C), duración (s)	Fragmento (pb)	Sequences (5'►3')
EGFP sentido	66, 15	72, 36	649	CTGGTCGAGCTGGACGGCGAC
EGFP anti-sentido				AGAGTGATCCCGGCGGCGGTC
hGDNF sentido	61, 15	72, 33	555	TTATGGGATGTCGTGGCTGT
hGDNF anti-sentido				GTCATCATCAAAGGCGATGG
rtTA-Ad sentido	60, 15	72, 33	401	CTGACAGGATGCAGAAGGAGAT
rtTA-Ad anti-sentido				AGTAACAGTCCGCCTAGAAGCA
Actina sentido	62, 15	72, 30	213	CTGACAGGATGCAGAAGGAGAT
Actina anti-sentido				AGTAACAGTCCGCCTAGAAGCA
Nurr1 sentido	60, 15	72, 33	565	TCCCTTCACAACCTCCACCA
Nurr1 anti-sentido				CCGTGCGAACCCTCTTTA

Nota: Los oligonucleótidos fueron diseñados con el programa Primer 3 (<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3> www.cgi)

5.6.2.4 Ensayos de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR)

El aislamiento, la preparación del RNA total y la reacción de retrotranscripción se realizó como se describió en el ensayo de RT-PCR. Se aisló el RNA total de la SN usando el reactivo Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) y luego, la preparación de RNA, se trató con DNasa I, libre de RNasas. La retrotranscripción se realizó con 1 µg de RNA total proveniente de la SN con la enzima SuperScript III (200 U) usando 0.1 mg de oligo dT (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se mezcló 1 µL del producto de reacción de retrotranscripción con la mezcla de reacción “TaqMan® Universal MasterMix 2X” y la sonda específica de “20X TaqMan®” (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), a un volumen final de 20 µL. La reacción de amplificación se realizó durante 45 ciclos, utilizando un termociclador en tiempo real, Rotor-Gene Q (Qiagen, Alemania). Las sondas TaqMan® específicas para los genes de interés

fueron: Rn00667869_m1 para β -actina de rata: Rn01402432_m1 para GDNF de rata; Rn00591740_m1 para MMP-3 de rata: Hs01931883_s1 para GDNF humano. Se utilizó el oligo sentido: 5'-GAAAGAGAGACACCTACCAC; el oligo anti-sentido: 5'-TCCAGGCCACATATGATTAG; y la sonda: 5'-FAM-AAAGGAAGGCAGGTTCCGGCTCC para el rtTA-Av (Applied Bioystems, Foster City, CA, EE.UU.). También se amplificaron los niveles de RNAm de β -actina para cada muestra y se utilizaron como control interno y normalización. Los valores del umbral de ciclado (Ct) para β -actina, rGDNF, MMP-3, hGDNF y rtTA-Av se midieron y calcularon usando el programa Rotor-Gene Q (Qiagen, Alemania). Los niveles relativos de transcripción se expresaron como la razón de cambio para la expresión génica y se calcularon usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [109,110]. Para las muestras control no tratadas, $\Delta\Delta Ct$ es igual a 0 y por lo tanto al sustituirlo en la ecuación esta se convierte en 2^0 lo cual es igual a 1, la razón de cambio en la expresión del gen rGDNF y MMP-3, en estado intacto, es igual a 1 [111].

5.6.2.5 Ensayos de doble o triple inmunofluorescencia indirecta

Ratas de la cepa Wistar transfectadas en la SNpc fueron perfundidas transcárdialmente con 100 mL de PBS, posteriormente con 150 mL de paraformaldehído al 4 % en PBS. Se obtuvieron los cerebros y se colocaron en una solución de paraformaldehído al 4 % durante 24 horas a 4 °C para su fijación. Finalizado este tiempo se colocaron en solución de sacarosa en PBS (30 %) en un periodo de 48 horas a 4 °C. Al término de este tratamiento, los cerebros fueron cortados para obtener rebanadas de 30 μ m de espesor en el plano coronal, utilizando un micrótopo de deslizamiento Leica SM100 (Leica Microsystems; Nussloch, Germany). Se realizó una inmunofluorescencia a los cortes mesencefálicos para mostrar las neuronas inmunoreactivas a TH, EGFP, rtTA-Av y hGDNF o Nurr1, del área de interés. Los cortes se permeabilizaron con una solución de tritón al 0.5 % en PBS haciendo 3 incubaciones de 10 minutos cada una. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con 10 % de suero normal de cabra o de caballo durante una hora a TA y después el tejido se lavó con PBS-Tritón al 0.025 % 3 veces durante 5 minutos. Posteriormente los cortes fueron incubados durante toda la noche a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-tirosina hidroxila monoclonal hecho en ratón (1/1000, Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EE.UU) y anti-EGFP policlinal hecho en conejo (1:1500, Abcam; Cambridge, MA, RU) o en combinación con el anti-GDNF policlinal hecho en conejo (1:250, Abcam; Inc.,

Cambridge, RU) y con el anti-TetR monoclonal hecho en ratón (que reconoce al rtTA-Av; 1:250, Clontech; Palo Alto, CA, EE.UU) o anti-Nurr1 hecho en conejo (M196, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, EE.UU). Después de la incubación con los anticuerpos primarios los cortes fueron lavados 3 veces durante 5 minutos con PBS-0.025 % tritón X-100 para continuar con la incubación del anticuerpo secundario durante 2 horas, a TA, con el siguiente anticuerpo secundario anti-ratón Texas Red hecho en cabra (1:900; Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE.UU) en combinación con el anticuerpo secundario anti-conejo alexa 488 hecho en pollo (1:200, Invitrogen; Grand Island, NY, EE.UU), y con el anti-ratón CY5 hecho en cabra (1:200, Invitrogen, Co., Grand Island, NY, EE.UU). Posteriormente los cortes fueron lavados con PBS-0.025 % Triton X-100 3 veces durante 5 minutos. Por último, los cortes fueron montados en cubreobjetos para inmunofluorescencia con Vectahield (Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE.UU) y posteriormente fuerónsellados con resina epóxica. La fluorescencia de los tejidos se analizaron con el objetivo 40 X o 63 X del microscopio Leica SP8 (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany).

5.6.3 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como valores de la media \pm desviación estándar (σ), obtenidos a partir de tres o seis experimentos independientes. El tamaño de la muestra se determinó para la prueba de ANOVA de una vía usando el software estadístico Sigma Plot v.12. Después de la prueba de normalidad con el análisis F de Snedecor “t” pareada se utilizó para determinar la significancia entre los grupos no transfectadas y transfectadas con Nurr1. La significancia entre los valores experimentales con sus controles se analizó mediante ANOVA de una vía seguido del análisis de Bonferroni, usando el programa estadístico Graph Pad Prism 5.0 (GradPad Software Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). La significancia estadística se estableció como $P < 0.05$.

6. Resultados

6.1 Caracterización de los plásmidos construidos

La selección de las clonas que contienen al plásmido de interés con el gen en orientación sentido, se llevó a cabo mediante ensayos de restricción enzimática y separados en gel de agarosa al 1%. Las enzimas utilizadas para caracterizar los plásmidos clonados se seleccionaron de acuerdo al patrón de restricción que producen, ya que aportan información respecto al sentido del gen o genes que contienen. Los perfiles de restricción fueron evaluados mediante el análisis *in silico* utilizando el software Vector NTI y el Laboratorio de Secuenciación de la FES-Iztacala, UNAM determinó la exactitud de las secuencias utilizando secuenciación automática del DNAP en un analizador genético modelo 3130XL (Applied Biosystems; Grand Island, NY, EE.UU.).

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad del promotor NBRE3x *in vitro* e *in vivo*, se procedió a construir los plásmidos que contienen al gen reportero EGFP o al gen que codifica para hGDNF en el vector de clonación pGL2-Basic, bajo el control transcripcional del promotor NBRE3x.

Para identificar al plásmido pNBRE3x-EGFP sentido, se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRI* y *Sall*. La doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *Sall* del pNBRE3x-EGFP generó un patrón de restricción de 2 bandas, que corresponden a 4723 pb y 10 pb (que en el gel no se observó) (Figura 5 A, línea 1). Este patrón de restricción corresponde al pNBRE3x-EGFP sentido. Se utilizó el plásmido pEGFP-N1 como control (Figura 5 A, línea 2).

Para identificar al plásmido pNBRE3x-hGDNF sentido, se utilizó la enzima de restricción *BsmI*. La digestión con esta enzima generó un patrón de restricción de 6 bandas que corresponden a 2750 pb, 972 pb, 517 pb, 157 pb y dos bandas de 93 pb (Figura 5 B, línea 1). Este patrón de restricción corresponde al pNBRE3x-hGDNF sentido. Se utilizó el plásmido pGL2-NBRE3x-Luc como control (Figura 5 B, línea 2).

Para identificar al plásmido pNBRE3x-Tet-On-Av sentido, se utilizaron las enzimas de restricción *NheI* y *EcoRI*. La doble digestión con estas enzimas generó un patrón de restricción de 2 bandas, una banda de 5788 pb y otra de 1144 pb (Figura 5 C, línea 1). Este patrón de restricción corresponde al pNBRE3x-Tet-On-Av sentido.

Para identificar al plásmido pTRE-Tight-EGFP sentido, se utilizaron las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRV*. La doble digestión con estas enzimas generó un patrón de restricción de 2 bandas, una banda de 2547 pb y otra de 768 pb (Figura 5 D, línea 1). Este patrón de restricción corresponde al pTRE-Tight-EGFP sentido.

Para identificar al plásmido pTRE-Tight-hGDNF sentido, se utilizó la enzima de restricción *BsmI*. La digestión con la enzima *BsmI* del pTRE-Tight-hGDNF generó un patrón de restricción de 2 bandas, una banda de 3064 pb y otra de 171 pb (Figura 5 E, línea 1). Este patrón de restricción corresponde al pTRE-Tight- hGDNF sentido.

Para identificar al plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP sentido, se utilizaron las enzimas de restricción *HindIII* y *SmaI*. La digestión con la enzima *HindIII* produjo una banda de 3308 pb y otra de 2001 pb (Figura 5 F, línea 2). La digestión con la enzima *SmaI* produjo una banda de 3024 pb y otra de 2285 pb (Figura 5 F, línea 3). Este patrón de restricción corresponde al pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP sentido.

Para identificar al plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF sentido, se utilizaron las enzimas de restricción *BsmI* y *HindIII*. La digestión con la enzima *BsmI* generó 4 bandas esperadas de 3233, 1481, 171 y 93 pb (Figura 5 G, línea 2). La digestión con la enzima *HindIII* generó 2 bandas esperadas de 3228 y otra de 93 pb (Figura 5 G, línea 3). Este patrón de restricción corresponde al pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF sentido. Los resultados de los ensayos de restricción demuestran la orientación correcta de los fragmentos clonados.

La figura 5 muestra los perfiles de restricción enzimática de los plásmidos construidos. Los mapas simplificados de los plásmidos correspondientes se muestran en la Figura 6.

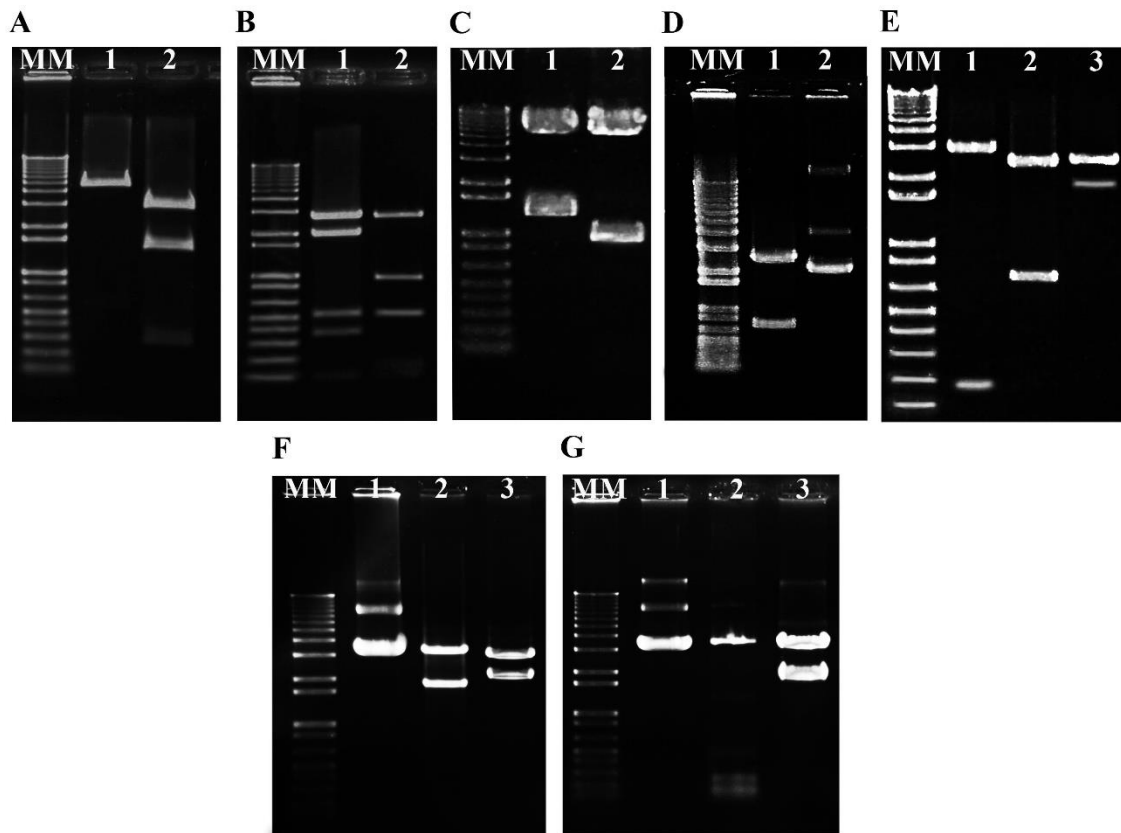


Figura 5. Perfiles de restricción enzimática de los plásmidos construidos. Figuras representativas del perfil de restricción enzimática evaluado con diferentes enzimas de restricción. **A)** pNBRE3x-EGFP digerido con las enzimas *EcoRI* y *SalI*. **B)** pNBRE3x-hGDNF digerido con la enzima *BsmI*. **C)** pNBRE3x-Tet-On-Av digerido con las enzimas *NheI* y *EcoRI*. **D)** pTRE-Tight-EGFP digerido con las enzimas *BamHI* y *EcoRV*. **E)** pTRE-Tight-hGDNF digerido con la enzima *BsmI*. **F)** pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP digerido con las enzimas *HindIII* (carril 2) y *SmaI* (carril 3). **G)** pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF, digerido con las enzimas *BsmI* (carril 2) y *HindIII* (carril 3). MM = Marcadores de peso molecular de 1 kpb.

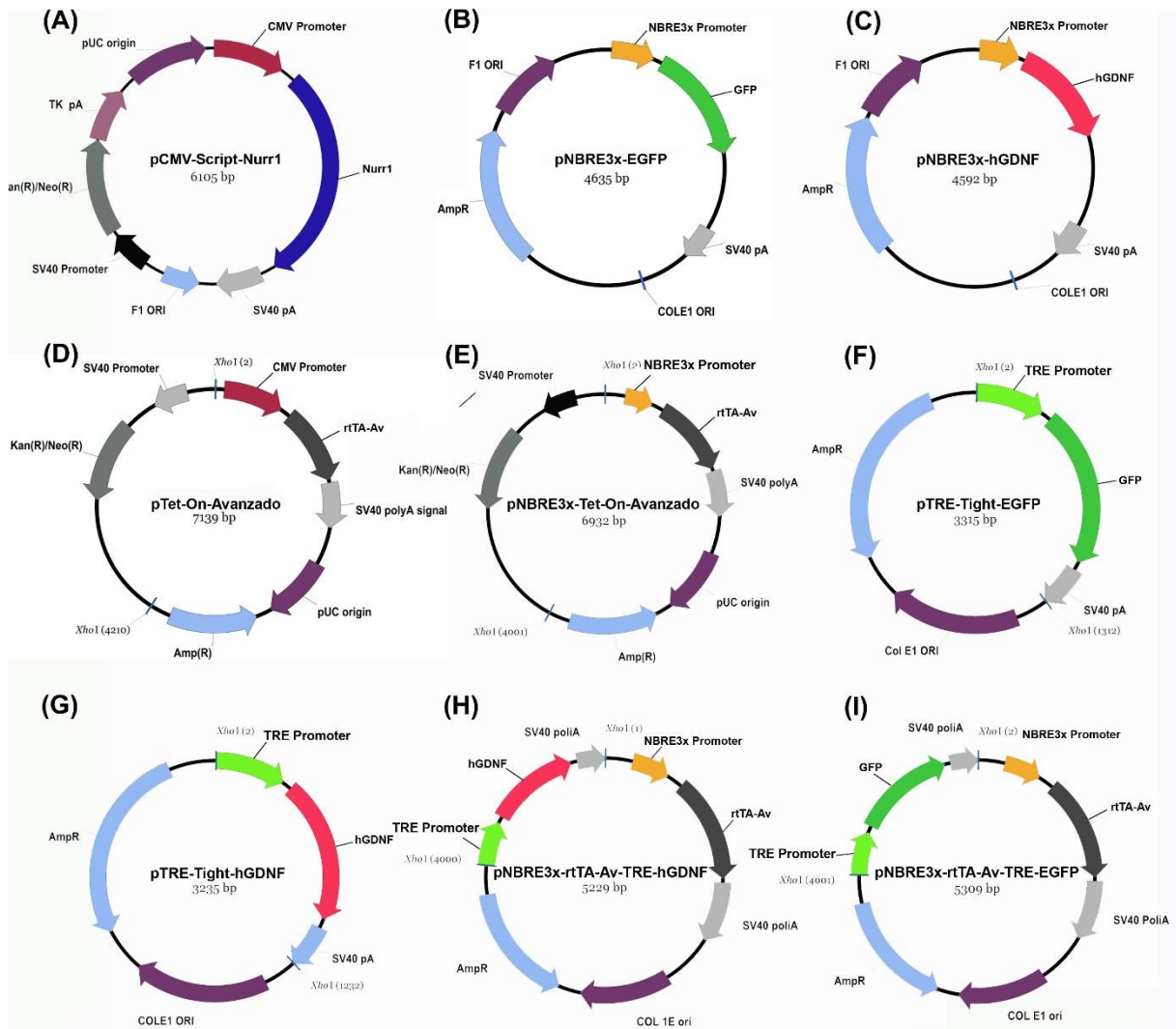


Figura 6. Mapas de los plásmidos construidos. **A)** pCMV-Script-Nurr1 (5.7 Kb) codifica para Nurr1 bajo el control transcripcional del promotor CMV. **B)** pNBRE3x-EGFP (4.5 kb) codifica para la EGFP, bajo el control transcripcional del promotor NBRE3x. **C)** pNBRE3x-hGDNF (4.5 kb) codifica para hGDNF, bajo el control del promotor NBRE3x. **D)** pTet-On-Avanzado (7.1 kb) codifica para la proteína rtTA-Av, bajo el control transcripcional del promotor CMV. **E)** pNBRE3x-Tet-On-Av (7.1 kb) codifica para el rtTA bajo el control del promotor NBRE3x. **F)** pTRE-Tight-EGFP (3.3 kb) codifica para EGFP bajo el control del promotor TRE. **G)** pTRE-Tight-hGDNF (3.2 kb) codifica para hGDNF bajo el control del promotor TRE. **H)** pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF (5.2 kb) codifica para el rtTA-Av, bajo el control transcripcional del promotor NBRE3x, y hGDNF bajo el control transcripcional del promotor TRE. **I)** pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP (5.3 kb) codifica para el rtTA-Av bajo el control transcripcional del promotor NBRE3x y codifica para EGFP bajo el control transcripcional de promotor TRE.

6.2 Transfección del pCMV-Script-Nurr1 en células N1E-115

La activación de los promotores hDAT y NBRE3x depende del factor de transcripción Nurr1 [89,93,112,113]. Sin embargo, las células N1E-115 donde se evalúa la actividad de las NPs de NTS-poliplex *in vitro* por poseer el NTSR1 [114,115], no expresan Nurr1. Para superar esta limitante, transfectamos las células N1E-115 con el pCMV-Script-Nurr1 y seleccionamos clonas utilizando el antibiótico G-418 (células N1E-115-Nurr1). El análisis de inmunofluorescencia indirecta reveló la presencia de la proteína Nurr1 en el núcleo de las células N1E-115-Nurr1 transfectadas, pero no en las células N1E-115 (Figura 7). El recuento celular automatizado reveló la presencia de Nurr1 en el 45 ± 1 % de las células N1E-115-Nurr1 (Figura 7).

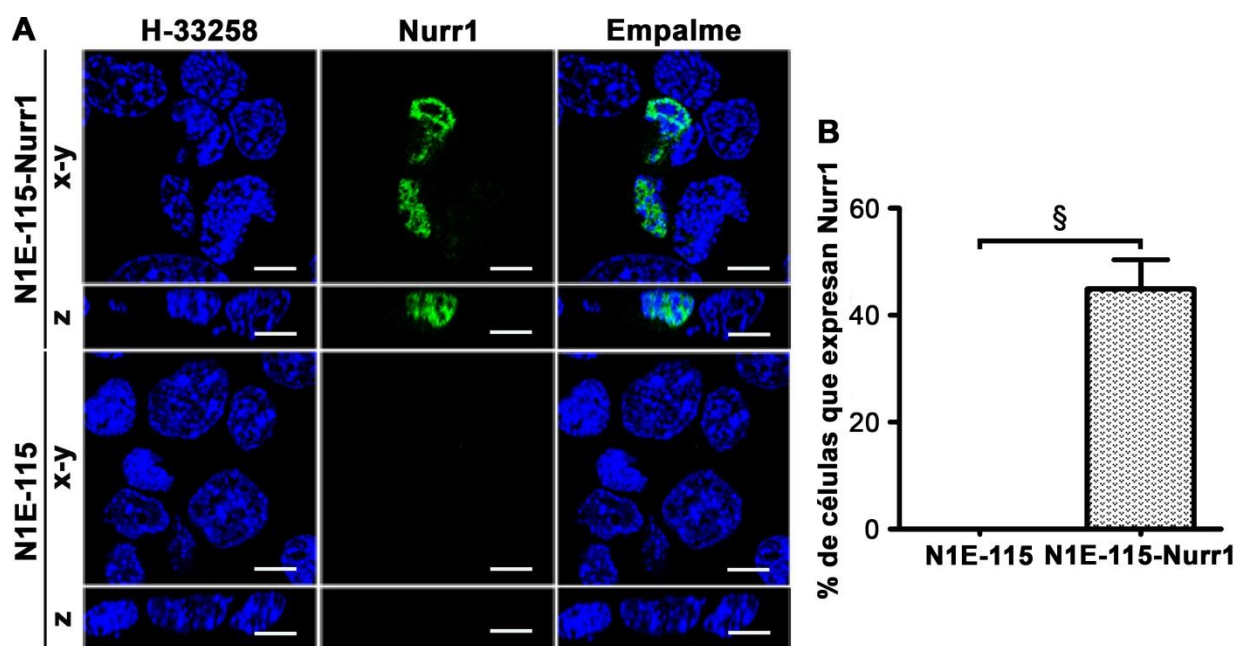


Figura 7. Modificación genética de las células N1E-115 para que expresen Nurr1 (N1E-115-Nurr1) mediante la transfección del plásmido pCMV-Script-Nurr1. A) Microfotografías representativas de secciones ópticas de $0.5 \mu\text{m}$ en el plano x-y (horizontal) y en el plano z (vertical) de la inmunorreactividad a Nurr1 y de la fluorescencia de Hoechst-33258 (H-33258), tinción nuclear. Células N1E-115 transfectadas con pCMV-Script-Nurr1 (N1E-115-Nurr1). Barra de calibración = $10 \mu\text{m}$. **B)** Gráfica que muestra el porcentaje de células que expresan Nurr1. El recuento celular se realizó en 3 campos de cada cubreobjeto ($n = 3$ cubreobjetos), utilizando el programa ImageJ 1.47v; Wayne Rasband, EE.UU. Análisis de *t* pareada; § $P < 0.0072$.

6.3 Síntesis del acarreador de neurotensina

El conjugado NTS-PLL-PF (nanovector de NTS, también llamado acarreador de NTS) se obtuvo en cinco etapas consecutivas. (1) síntesis del conjugado PLL-SPDP, (2) síntesis del conjugado PLL-SPDP-SH, (3) síntesis del conjugado NTS-SPDP, (4) síntesis del conjugado PF-SPDP y (5) síntesis del conjugado NTS-PLL-PF. En la primera etapa, se conjugó el SPDP a grupos amino de la PLL. El cromatograma de la purificación del conjugado PLL-SPDP en columna (Figura 8. A) muestra dos picos de absorción a 220 nm y a 280 nm de longitud de onda. El primer pico (fracciones 3 a 6) corresponde al conjugado PLL-SPDP (52,043 Da), la PLL absorbe a 220 nm y por la inclusión de un grupo aromático absorbe a 280 nm. El segundo pico (fracciones 7 a 12) corresponde al residuo N-hidroxisuccinimida (NHS; 114 Da) liberado en la reacción y el SPDP libre (425.5 Da). En la segunda etapa, se reduce el conjugado PLL-SPDP con DTT para generar el conjugado altamente reactivo PLL-SPDP-SH. El cromatograma de purificación de este conjugado mostró 2 picos de absorción a 220 nm de longitud de onda (Fig 8B), el primer pico (fracciones 3 a 6) corresponde a la elución del conjugado PLL-SPDP-SH (50,631 Da) y el segundo pico (fracciones 9 al 15), corresponden a la piridina-2-tiona liberada durante la reacción, que también absorbe a 280 y 343 nm.

En la tercera etapa, el conjugado NTS-SPDP fue purificado en una columna y el cromatograma muestra un pico de absorbancia a 215 nm (fracciones 49-78), que de acuerdo al límite de exclusión de la resina (< 700 Da), corresponde al conjugado de NTS-SPDP, de 2,419 Da (Figura 8C).

En la cuarta etapa, el conjugado PF-SPDP fue purificado en una columna y el cromatograma muestra dos picos de absorbancia a 220 y 280 nm (Fig 8D). De acuerdo al límite de exclusión de la resina (< 1,500 Da), el primer pico (fracciones 48 a 76) corresponde al conjugado de PF-SPDP (3,317 Da) y el segundo (fracciones 80 a 120) corresponde al SPDP libre.

En la quinta etapa, el conjugado NTS-PLL-PF fue purificado en una columna “*Econo-Column Chromatography*” de 50 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro, conteniendo resina Biogel A-15m, se leyó a 215, 280 y 343 nm. El cromatograma de purificación a 215 y 280 nm muestra 3 picos. En los dos primeros picos eluyen los conjugados de alto peso molecular (pico 1, fracciones 25-40, que en el cromatograma correspondiente no se parecía fácilmente, ver Figura 6 E), de bajo peso molecular (pico 2, fracciones 47-70), y en el tercer pico (fracciones 76-95) donde eluye la piridina-2-tiona (Figura 8 E). Los conjugados más eficientes para la transfección son los de bajo peso molecular con un peso promedio de 133 kDa (66 a 200 kDa), que calculado por interpolación en la curva estándar de calibración de la columna (Figura 8 F y G).

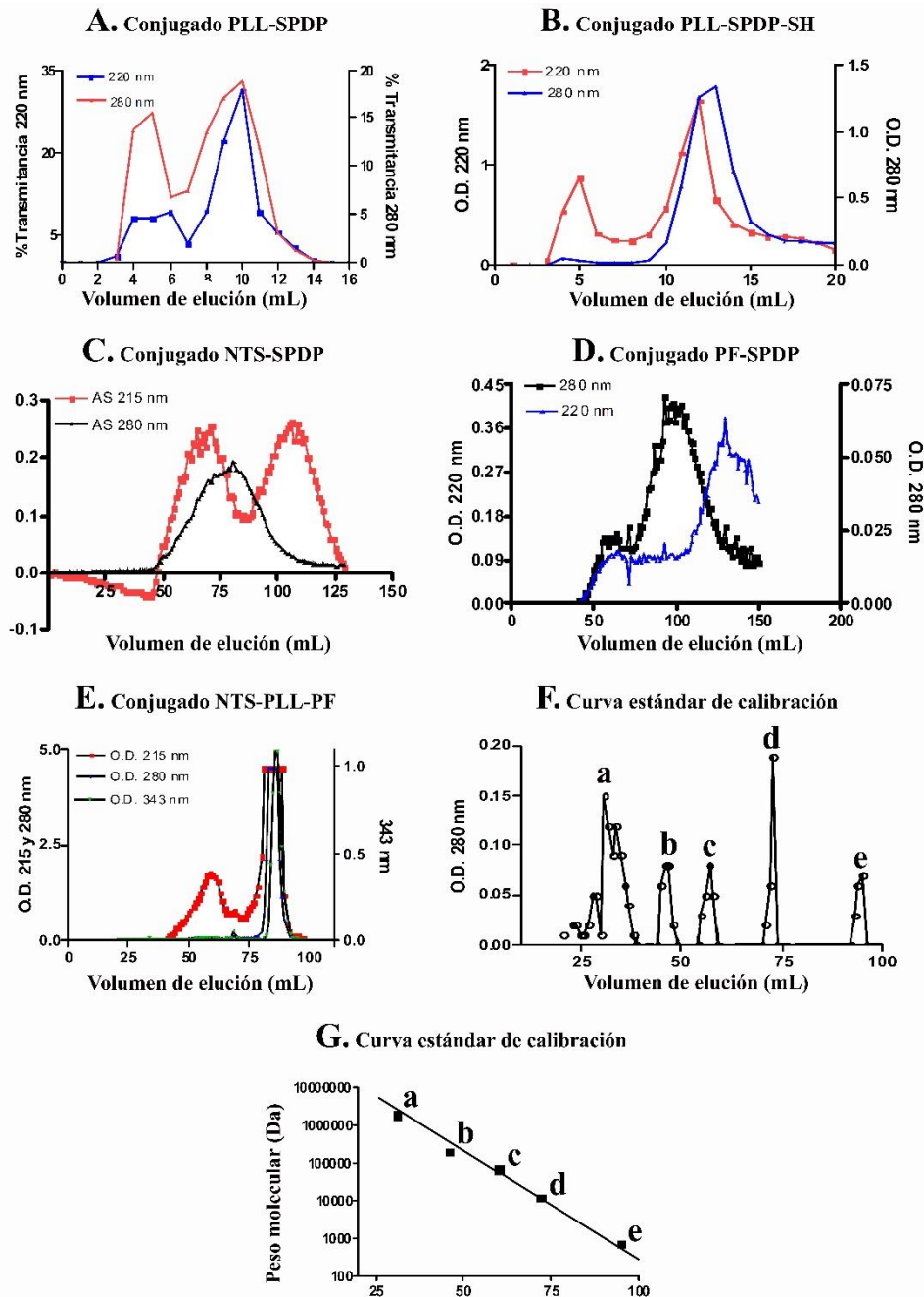


Figura 8. Cromatogramas de purificación de los conjugados NTS, PF, y PLL con SPDP. La purificación del conjugado PLL-SPDP (A) y del conjugado PLL-SPDP-SH (B) se realizó en una columna con resina EconoPac DG10. La purificación del conjugado NTS-SPDP se realizó en Sephadex G10 (C) y la purificación del conjugado PF-SPDP en Sephadex G15 (D). El conjugado NTS-PLL-PF se purificó en una comuna con Biogel A- 1.5 m (E). Cromatograma de elución de los estándares de peso molecular utilizados para la calibración de la columna de Biogel A-15 m (F). Curva de calibración de los marcadores utilizados en B (G). La fase móvil fue guanidina 2 M en 0.1 M de Hepes, pH 7.4.

6.4 Construcción de las nanopartículas de NTS-poliplex

La construcción de las NPs de NTS-poliplex, se realizó en 2 pasos secuenciales: 1) formación del complejo DNAP-PK y 2) formación del complejo (DNAP-PK):NTS-PLL-PF. En el primer paso se determinó la CMO del complejo DNAP-PK, mediante ensayos de retardo electroforético, mientras que el segundo paso, se determinó la CMO del complejo (DNAP-PK)-acarreador de NTS, mediante ensayos de retención electroforética, como se describe a continuación.

6.4.1 Ensayos de retardo electroforético de los plásmidos de interés (complejo DNAP-PK)

La figura 9 muestra los resultados de los ensayos del patrón de corrimiento electroforético de retardo de los diferentes plásmidos evaluados en este proyecto. La carga neta positiva del PK permite la unión electrostática al DNAP, la cual se demuestra por medio de geles de retardo (Agarosa al 0.8% en TAE). Los geles de los plásmidos pNBRE3x-EGFP (Figura 9 A), pNBRE3x-hGDNF (Figura 9 B), pTet-On-Av (Fig 9 C), pTRE-Tight-EGFP (Figura 9 D), pTRE-Tight-hGDNF (Figura 9 E), pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP (Figura 9 F) y pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF (Figura 9 G) muestran que el retardo de su perfil electroforético está en función de la concentración del PK (en concentración μM). Todos los plásmidos muestran un perfil de retardo diferente y el criterio de selección de la CMO (que se muestra con un “*”) es aquella donde se observe un ligero retardo electroforético de la banda de menor peso molecular (forma superenrollada) de 1 a 2 mm por encima de la banda control de menor peso molecular (forma superenrollada; carril C). Este criterio de evaluación, fue establecido de manera empírica y asegura alta eficiencia de transfección *in vitro e in vivo* [46].

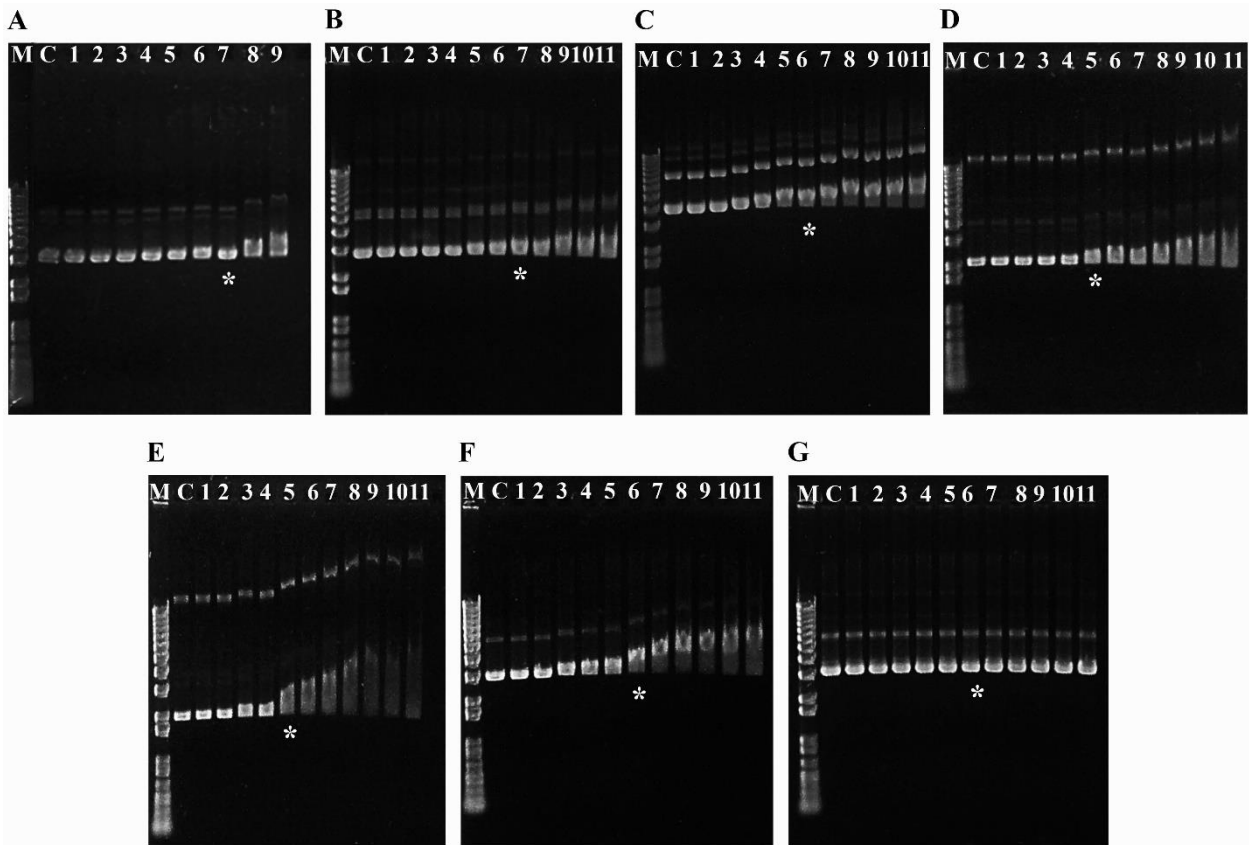


Figura 9. Ensayos de retardo electroforético de los diferentes plásmidos construidos. **A)** pNBRE3x-EGFP (pk = 7 μ M), **B)** pNBRE3x-hGDNF (pk = 7 μ M), **C)** pTet-On-Av (pk = 6 μ M), **D)** pTRE-Tight-EGFP (pk = 5 μ M), **E)** pTRE-Tight-hGDNF (pk = 5 μ M), **F)** pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP (pk = 6 μ M). **G)** pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF (pk = 6 μ M) Carriles; M = Marcador de peso molecular, C = Control electroforético del DNAp, 6 nM, Carriles (1-11) DNAp; 6 nM + PK (1-11 μ M con una Δ de 1 μ M). La R.M.O. esta señalada con un “*” en el carril del gel correspondiente.

6.4.2 *Ensayos de retención electroforética de los plásmidos de interés [complejo (DNAP-PK): acarreador de neurotensina]*

La figura 10, muestra los resultados de los ensayos del perfil electroforético de retención de los diferentes plásmidos evaluados en este proyecto. La carga neta positiva del complejo NTS-PPL-PF permite la unión electrostática al DNAP (con cargas positivas libres) del complejo DNAP-PK. Los geles de los plásmidos, pNBRE3x-EGFP (Figura 10 A), pNBRE3x-hGDNF (Figura 10 B), pTet-On-Av (Fig 10 C), pTRE-Tight-EGFP (Figura 10 D), pTRE-Tight-hGDNF (Figura 104 E), pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP (Figura 10 F) y pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF (Figura 10 G) muestran que el perfil de retención electroforético está en función de la concentración del complejo NTS-PLL-PF (nM). Cada plásmido evaluado muestra un perfil de retención diferente y el criterio de selección de la concentración molar óptima (CMO, se muestra con un “**”) es aquella donde se observa un 100 % de retención de la bandas en el pozo del gel. Se determinó que para los plásmidos pNBRE3x-EGFP, pNBRE3x-hGDNF, pTet-On-Av, y pNBRE3x-Tet-On-Av-EGFP la CMO fue de 162 nM. Para los plásmidos pTRE-Tight-EGFP, pTRE-Tight-hGDNF, la CMO fue de 144 nM y para el pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF la CMO fue de 216 nM.

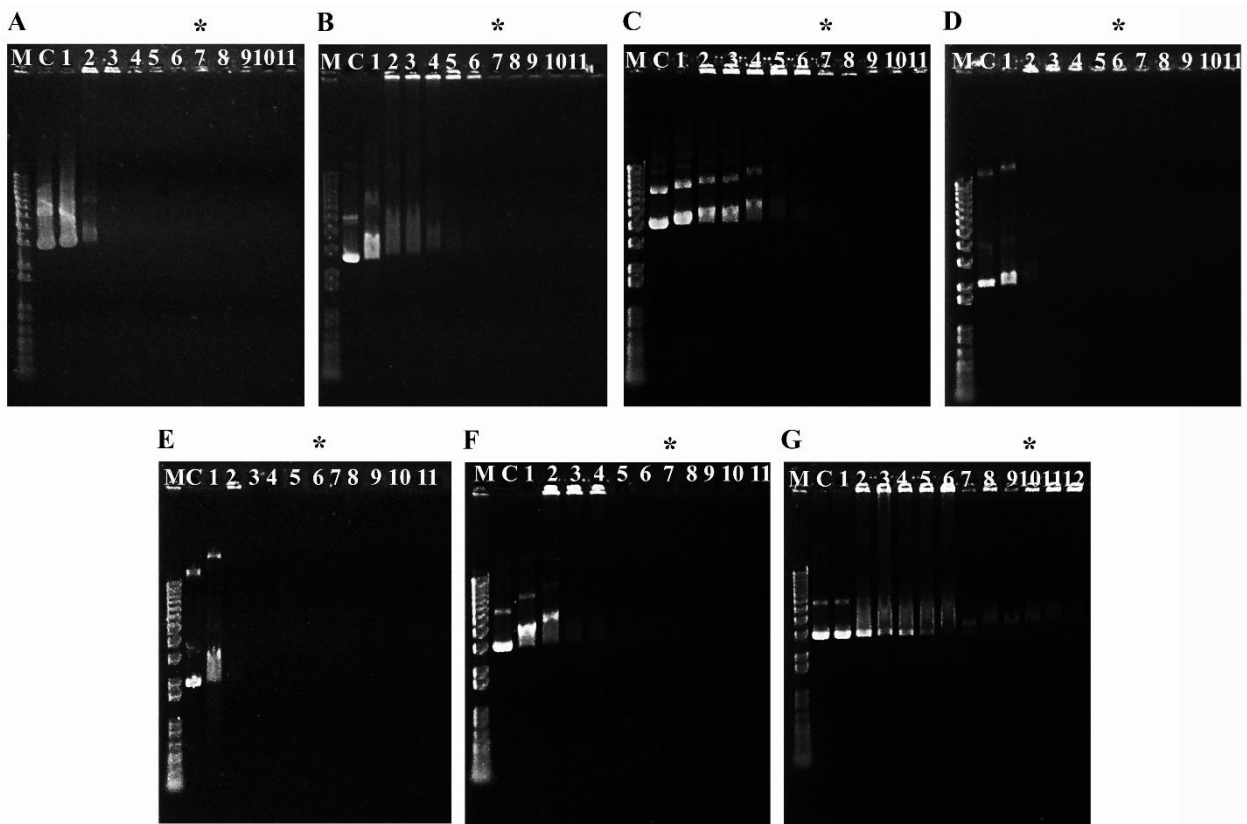


Figura 10. Ensayos de retención electroforética de los diferentes plásmidos evaluados. A) pNBRE3x-EGFP (1/27), B) pNBRE3x-hGDNF, C) pTet-On-Av, D) pTRE-Tight-EGFP, E) pTRE-Tight-hGDNF, F) pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP y G) pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF. Carriles; M = Marcador de peso molecular, C = Control electroforético del DNAp (6 nM), Carriles 1 control electroforético del complejo DNAp-PK, Carriles (2-12) DNAp-PK + acarreador de NTS (concentración molar óptima respecto a 6 nM de DNAp; con una Δ de 18 nM de NTS-acarreador). La CMO esta señalada con un “*” encima del carril correspondiente de cada imagen.

La concentración molar óptima del complejo DNAp-PK fue utilizada para unir electrostáticamente el acarreador de NTS y así formar a las NPs de NTS-poliplex. Se evaluaron varias concentraciones molares y se determinó aquella concentración que produjo la máxima eficiencia de expresión del transgén. A la CMO de los componentes de las NPs de NTS-poliplex, para cada plásmido evaluado, que produjo la máxima eficiencia de expresión del transgén y se utilizó para determinar la funcionalidad de las variantes del sistema regulable Tet-On-Av *in vitro* (Tabla 2), e *in vivo* (Tabla 3).

Para los ensayos de transfección *in vivo*, las NPs de NTS-poliplex se formaron en ausencia de suero bovino fetal y 5 veces más concentradas (volumen final de 100 μ L), en comparación a las NPs construidas para los ensayos de transfección *in vitro* (volumen final de 300 μ L), como se sugiere en Arango-Rodriguez y col. [46], y lograr transfecciones altamente eficientes.

Tabla 2. Concentraciones usadas para formar las NPs de NTS-poliplex en los ensayos *in vitro*

	Componentes					
	DNAP		PK		Acarreador de NTS	
	[nM]	ng/ μ L	[μ M]	pg/ μ L	[nM]	ng/ μ L
pNBRE3x-EGFP	6	18.52	7	13.36	162	18.38
pNBRE3x-hGDNF	6	18.12	7	13.36	162	18.38
pTet-On-Av	6	28.12	6	11.44	162	18.38
pTRE-Tight-EGFP	6	13.05	5	9.54	144	16.34
pTRE-Tight-hGDNF	6	12.80	5	9.54	144	16.34
pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP	6	21.00	6	11.44	162	18.38
pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF	6	20.63	6	11.44	216	24.5

Nota: Se utilizó medio DMEM no suplementado como vehículo y 1 % de suero bovino fetal.

Tabla 3. Concentraciones usadas para formar las NPs de NTS-poliplex en los ensayos *in vivo*

	Componentes					
	DNAP		PK		Acarreador de NTS	
	[nM]	ng/ μ L	[μ M]	pg/ μ L	[nM]	ng/ μ L
pNBRE3x-EGFP	30	92.62	35	66.82	810	91.9
pNBRE3x-hGDNF	30	90.63	35	66.82	810	91.9
pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP	30	105.08	30	57.27	810	91.9
pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF	30	103.18	30	57.27	1080	122.5

Nota: Se utilizó medio DMEM no suplementado como vehículo.

6.4.3 Propiedades físicas de las nanopartículas de NTS-poliplex con los plásmidos bifuncionales

El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), mostró que las NPs de NTS-poliplex conteniendo el pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF (Figura 11, A y B) o pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-GFP (Figura 11, E y F) tienen un diámetro de entre 40 y 120 nm.

El análisis de dispersión de luz dinámica (DLS, por sus siglas en inglés), mostró que el diámetro promedio de las NPs de NTS-poliplex que contenían el pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF fue de 185,7 nm y un potencial zeta promedio de + 22.6 mV (Figura 11, C y D), mientras que las NPs que contenían el plásmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP tuvieron un diámetro promedio de 179,3 nm y un potencial zeta promedio de + 30.9 mV (Figura 11, G y H).

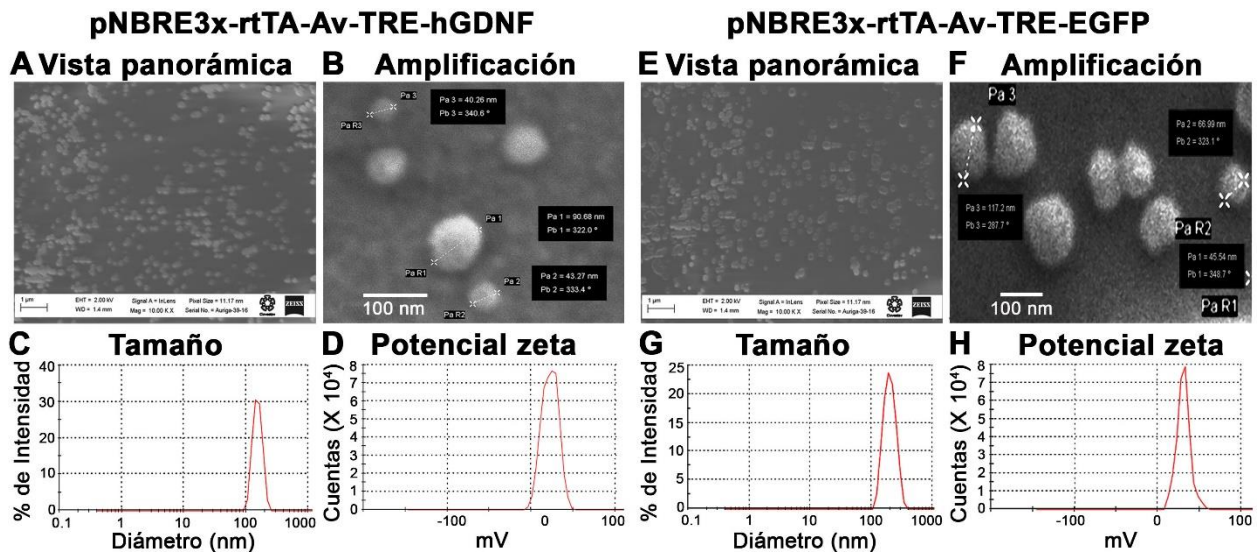


Figura 11. Características físicas de las nanopartículas de NTS-poliplex conteniendo los plásmidos bifuncionales. Micrografías analizadas por “SEM”; y distribuciones de tamaño y potencial zeta analizadas por “DLS”.

6.5 Evaluación de la actividad del promotor NBRE3x en células N1E-115-Nurr1

Para evaluar la actividad del promotor NBRE3x *in vitro*, mediante las NPs de NTS-poliplex, se procedió a transfectar los plásmidos pNBRE3x-EGFP y pNBRE3x-hGDNF en la clona celular N1E-115-Nurr1. Se construyeron NPs de NTS-poliplex conteniendo el pNBRE3x-EGFP o pNBRE3x-hGDNF (Tabla 3) y se transfectaron en células N1E-115-Nurr1. En ambos grupos control (células N1E-115, transfectadas con el plásmido respectivo), no se observó expresión basal del transgén en esta clona celular (Figuras 12 A y B). En contraste, se observó la presencia de GFP en el 21 ± 1 % de las células N1E-115-Nurr1 transfectadas con el pNBRE3x-EGFP (Figura 12 A y C). La presencia de la inmunorreactividad a hGDNF se observó en el 9 ± 1 % de las células N1E-115-Nurr1 transfectadas con el pNBRE3x-hGDNF (Figura 12 B y C). La menor cantidad de células que expresan hGDNF en comparación al GFP, se puede deber a la liberación de hGDNF al medio de cultivo, pues es un factor neurotrófico que ejerce su acción extracelularmente [39,40].

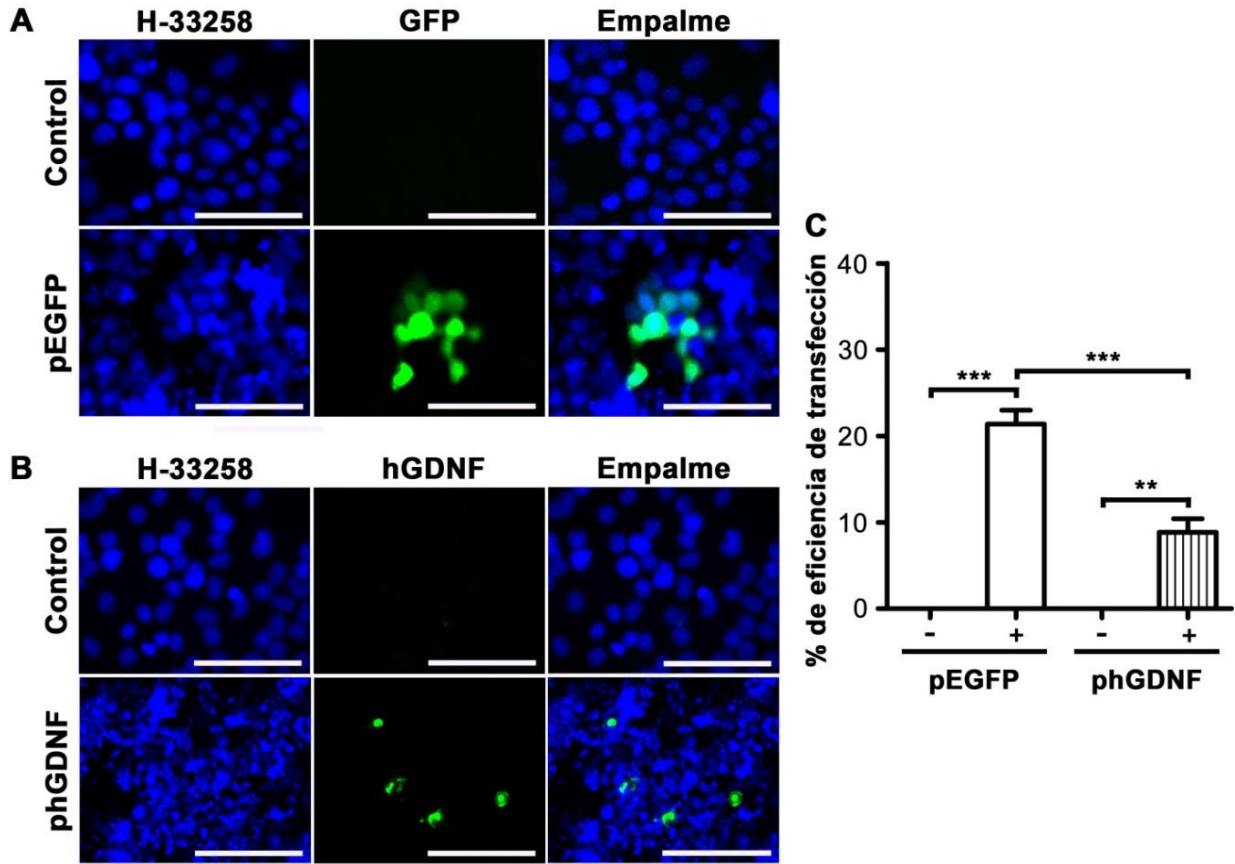


Figura 12. Actividad del promotor NBRE3x en células N1E-115-Nurr1. A) Células transfectadas con las NPs de NTS-poliplex conteniendo el plásmido pNBRE3x-EGFP (pEGFP) o pNBRE3x-hGDNF (phGDNF) B). Micrografías de epifluorescencia representativas de la fluorescencia nativa de GFP o de la inmunorreactividad a hGDNF. Control = células N1E-115 transfectadas con el plásmido respectivo. Barra de calibración = 100 μ m. C) Porcentaje de la eficiencia de transfección de GFP o hGDNF con respecto al total de células contrateñidas con Hoechst-33258 (H-33258). El recuento celular se realizó en 3 campos de cada cubreobjeto ($n = 3$), utilizando el programa ImageJ 1.47v; Wayne Rasband, EE.UU. Análisis de ANOVA de una vía y Bonferroni; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

6.6 Actividad *in vitro* del sistema regulable Tet-On Avanzado dual y bifuncional que codifica para GFP

Para determinar la eficiencia de transfección del sistema regulable Tet-On Avanzado, que codifica para GFP, procedimos a transfectar el par de plásmidos correspondientes al sistema Tet-On Avanzado original (usado como control positivo de la inducción de la expresión génica) o el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP en presencia (Dox +) o ausencia de doxiciclina (Dox -). Utilizando las NPs de NTS-poliplex se pudieron cotransfectar dos plásmidos diferentes en células N1E-115-Nurr1 (pTet-On-Av + pTRE-Tight-EGFP), que corresponden al sistema regulable Tet-On Avanzado dual original, como se muestra en las imágenes (Figura 13 A), así como también se pudo transfectar el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP. En ambas variantes del sistema de regulación y después de la transfección, se administró Dox a 100 ng/mL, durante dos días renovándolo cada día. El conteo automatizado reveló que la proporción de células que expresan GFP con el sistema regulable dual original (Figura 13 A) o con el sistema regulable bifuncional (Figura 13 B) fue de aproximadamente $10 \pm 1 \%$ y $27 \pm 1 \%$ respectivamente (Figura 13 C). Este análisis reveló que el sistema regulable bifuncional fue 2.7 veces más eficiente que el sistema regulable dual original. El control negativo en cada experimento, se llevó a cabo en ausencia de Dox (Dox -). En ambas variantes del sistema regulable no se observó expresión basal transgénica en ausencia de Dox (Figura 13 A, B y C).

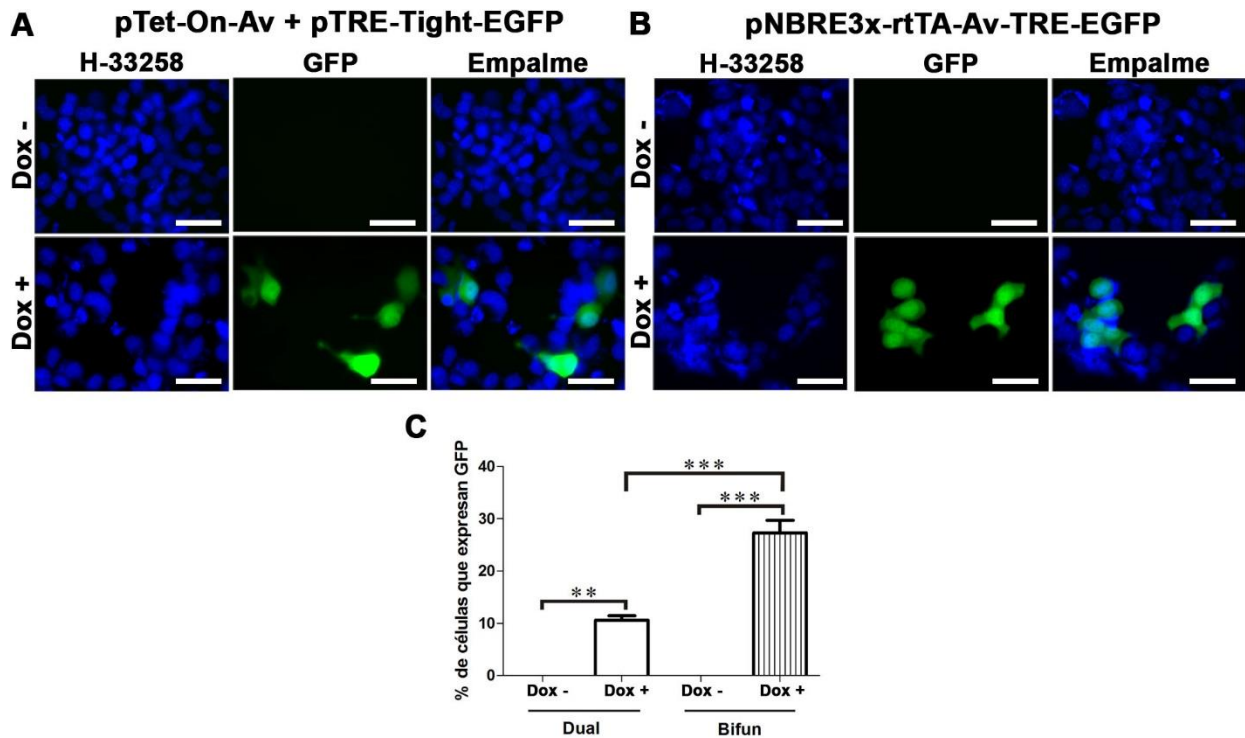


Figura 13. Expresión de GFP inducida por el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP en células N1E-115-Nurr1. Mediante NPs de NTS-poliplex se transfectó el par de plásmidos pTet-On-Av + pTRE-Tight-EGFP (**A**) o el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP (**B**). Micrografías de epifluorescencia representativas de la fluorescencia nativa de GFP, con la tinción nuclear de Hoechst-33258. Dox - = estado quiescente de la expresión transgénica en ausencia de doxiciiclina. Dox + = Activación de la expresión transgénica por la administración de 100 ng/mL de doxiciiclina. Barra de calibración = 50 μ m. **C**) Porcentaje de células que expresan GFP con respecto al total de células contrateñidas con Hoechst-33258. El recuento celular se realizó en 3 campos de cada cubreobjeto ($n = 3$), utilizando el programa ImageJ 1.47v; Wayne Rasband, EE.UU. Análisis de ANOVA de una vía seguido del análisis de Bonferroni; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

6.7 Actividad *in vitro* del sistema regulable Tet-On Avanzado dual y bifuncional que codifica para hGDNF

Para evaluar la eficiencia de transfección del sistema regulable Tet-On Avanzado, que codifica para hGDNF, procedimos a transfectar el par de plásmidos correspondientes al sistema Tet-On Avanzado original (usado como control positivo de la inducción de la expresión génica) o el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF en presencia (Dox +) o ausencia de doxiciclina (Dox -). Utilizando las NPs de NTS-poliplex se pudo co-transfectar dos plásmidos diferentes en células N1E-115-Nurr1 (pTet-On-Av + pTRE-Tight-hGDNF), que corresponden al sistema regulable Tet-On Avanzado original dual, como se muestra en las imágenes de la Figura 14 A, así como también se pudo transfectar el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF. En ambas variantes del sistema de regulación y después de la transfección, se administró Dox a 100 ng/mL.día, durante dos días. El conteo automatizado reveló que la proporción de células que expresan hGDNF con el sistema regulable dual original o con el sistema regulable bifuncional fue de aproximadamente el $8 \pm 1 \%$ y $23 \pm 1 \%$ respectivamente (Figura 14 C). Este análisis reveló que el sistema regulable bifuncional fue 2.8 veces más eficiente que el sistema regulable dual original. El control negativo en cada experimento, se llevó a cabo en ausencia de Dox. En ambas variantes del sistema regulable no se observó expresión transgénica basal en ausencia de Dox (Figura 14 A, B y C).

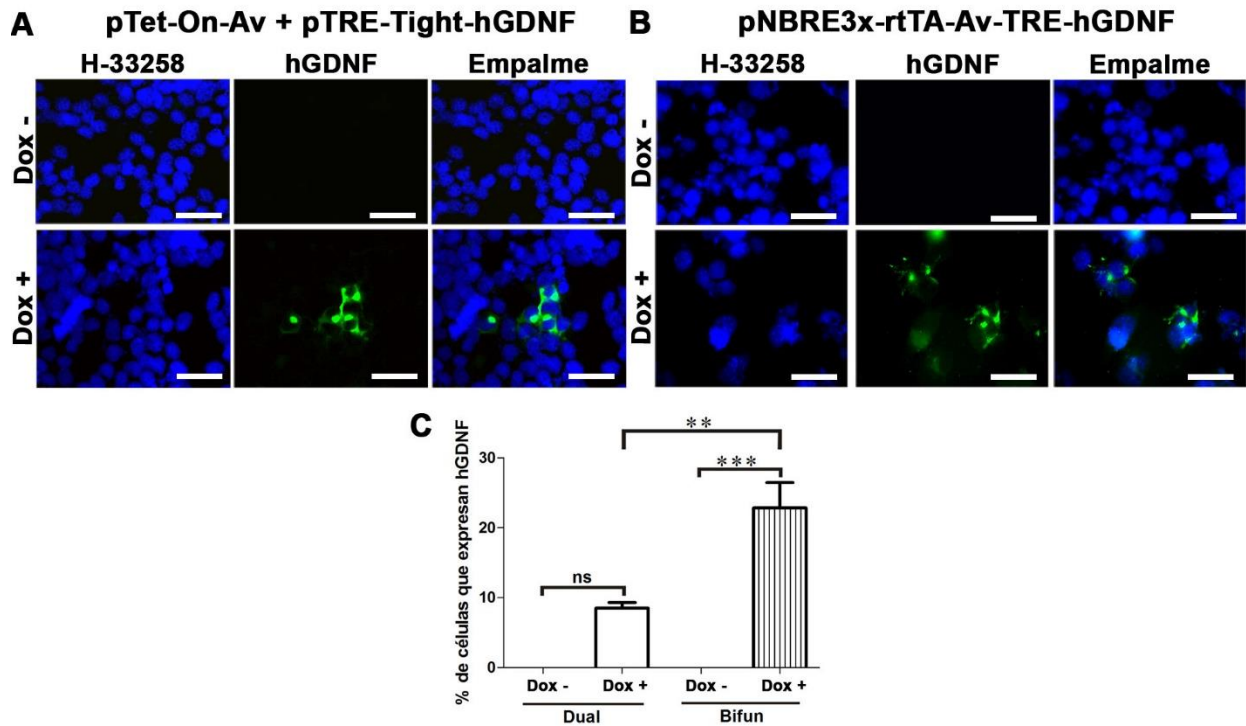


Figura 14. Expresión de hGDNF inducida por el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF en células N1E-115-Nurr1. Mediante las NPs de NTS-poliplex se transfectó el par de plásmidos pTet-On-Av + pTRE-Tight-hGDNF (**A**) o el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF (**B**). Micrografías de epifluorescencia representativas de la inmunoreactividad a hGDNF con la tinción nuclear de Hoechst-33258. Dox -, estado basal de la expresión transgénica en ausencia de doxiciclina. Dox +, Expresión transgénica inducida por la administración de 2 dosis de 100 ng/mL/día de doxiciclina. Barra de calibración = 50 μ m. **C**) Porcentaje de células que expresan hGDNF con respecto al total de células contrateñidas con Hoechst-33258. El recuento celular se realizó en 3 campos de cada cubreobjeto ($n = 3$), utilizando el programa ImageJ 1.47v; Wayne Rasband, EE.UU. Análisis de ANOVA de una vía y Bonferroni; ns, no significativo; ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

6.8 Localización celular del hGDNF expresado en células NIE-115-Nurr1

En los experimentos de inducción de la expresión de los transgenes GFP y hGDNF *in vitro*, ya sea del plásmido pNBRE3x-hGDNF o del sistema regulable original pTet-On + pTRE-Tight-hGDNF o del sistema regulable bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF, se observó menor eficiencia de expresión del hGDNF, en comparación con los experimentos realizados con el gen GFP. Esta observación puede explicarse parcialmente, debido a que la proteína GDNF transfectada *in vitro* tiene la capacidad de liberarse al medio de cultivo. En adición, en un reporte previo, se utilizó befeldrina A (un bloqueador del transporte vesicular del retículo endoplásmico al aparato de Golgi), se observó disminución de los niveles de proteína GDNF, sugiriendo que GDNF es procesada en el aparato de Golgi y posteriormente liberada al medio extracelular por exocitosis [116].

Con base en este reporte, realizamos un ensayo de doble IF indirecta contra hGDNF y Golgin-97 (marcador del aparato de Golgi), en donde se observa que hGDNF colocaliza con Golgin-97 (Figura 15), sugiriendo que el hGDNF transfectado puede liberarse al medio de cultivo. Estos experimentos sugieren que el número de células que expresan hGDNF es más baja, comparada con el número de células que expresan el transgen reportero GFP, debido a que el hGDNF se libera al medio de cultivo observándose menos células que expresan hGDNF citosólico.

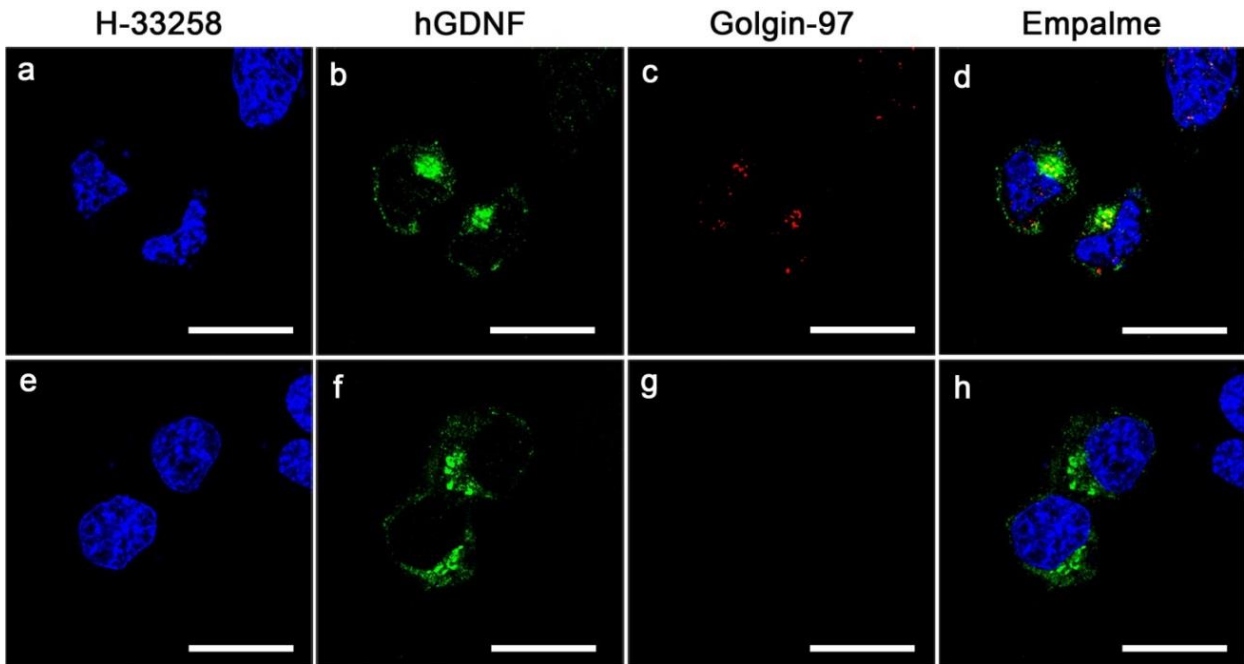


Figura 15. Colocalización del hGDNF expresado en células N1E-115-Nurr1 con Golgin-97. Las células N1E-115-Nurr1 fueron transfectadas con las NPs de NTS-políplex conteniendo el plásmido pNBRE3x-hGDNF. Micrografías representativas de cortes confocales (0.5 μm de espesor) que ilustra la inmunorreactividad a hGDNF y Golgin-97 (a-d). El control negativo corresponden a células N1E-115-Nurr1 transfectadas y sometidas al proceso de inmunofluorescencia indirecta en ausencia de anticuerpo anti-Golgin97 (e-h). Los núcleos se tiñeron con Hoechst-33258 (H-33258). Barra de calibración = 25 μm .

6.9 Presencia de Nurr1 en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de rata

El factor transcripcional Nurr1 se expresa constitutivamente en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y participa regulando el fenotipo dopaminérgico, así como la expresión del transportador de dopamina. Confirmamos la expresión bilateral de Nurr1 en la SNpc mediante ensayos de RT-PCR y por doble inmunofluorescencia indirecta ($n = 2$ ratas en cada grupo experimental). El ensayo de RT-PCR mostró la expresión del ARNm que codifica para Nurr1 en la *substantia nigra* tanto del lado derecho (D) como del lado izquierdo (I) (Figura 16 A). Los ensayos de inmunofluorescencia indirecta mostraron la inmunorreactividad a Nurr1 en células TH positivas (Figura 16 B). La mayor presencia de Nurr1 se colocalizó en células TH (+) de la SNpc (Figura 16 B). En el grupo control negativo de la técnica, en presencia del anticuerpo control de isotipo de IgG de conejo, no se observó inmunorreactividad a Nurr1 (Figura 16 B).

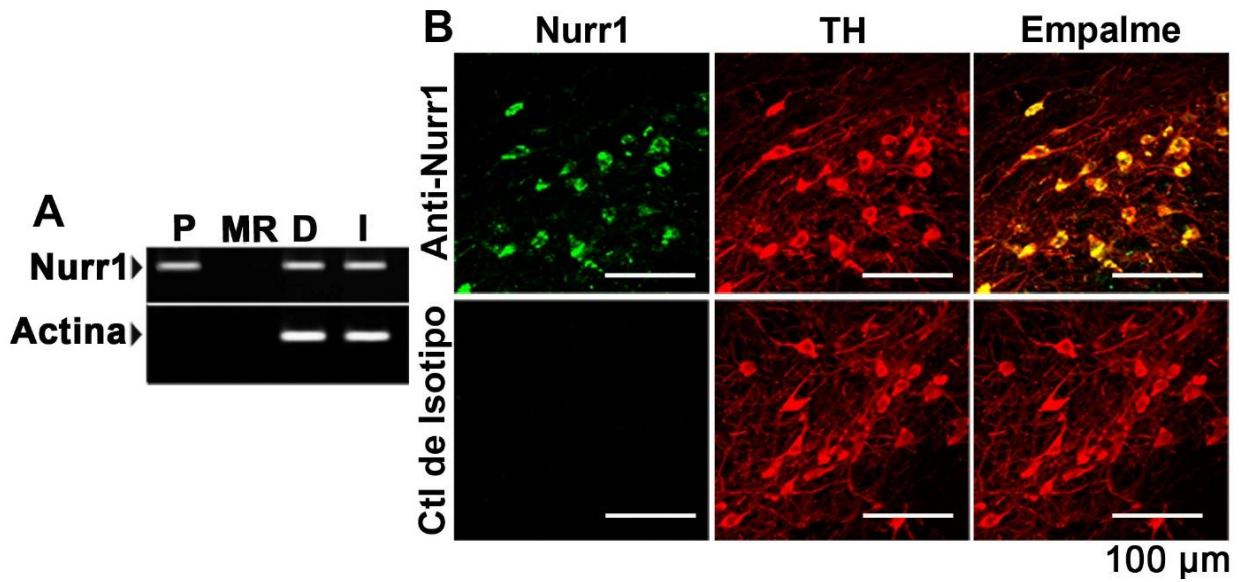


Figura 16. Expresión endógena de Nurr1 en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de rata. **A)** Fotografía representativa de un gel de agarosa que muestra las bandas de los amplicones de Nurr1 (565 pb) y de actina (213 pb) en la SNpc derecha (D) e izquierda (I) P, PCR del plásmido pCMV-Script-Nurr1 usado como control positivo. MR, mezcla de la reacción de PCR sin DNAC usada com control negativo. **B)** Micrografías confocales representativas de la inmunorreactividad a Nurr1 y TH. Control de isotipo (Ctl), control de isotipo de IgG de conejo usado a la misma concentración que el anticuerpo anti-Nurr1.

6.10 Sitio de inyección en la *substantia nigra pars compacta* de rata

La inyección estereotáxica de fucsina en las coordenadas teóricas elegidas para la región dorsal de la SNpc, las cuales corresponde a: AP + 2.5 mm de la bregma, ML + 2.0 mm de la línea media y DV - 6.7 mm de la dura madre, muestra que a los 5 minutos postinyección del colorante fucsina revelado con violeta de cresilo, las coordenadas elegidas están directamente sobre el borde dorsal de la SNpc, sin que se ejerza daño mecánico sobre dicha estructura, por otro lado este sitio de inyección no invade ni daña el VTA.

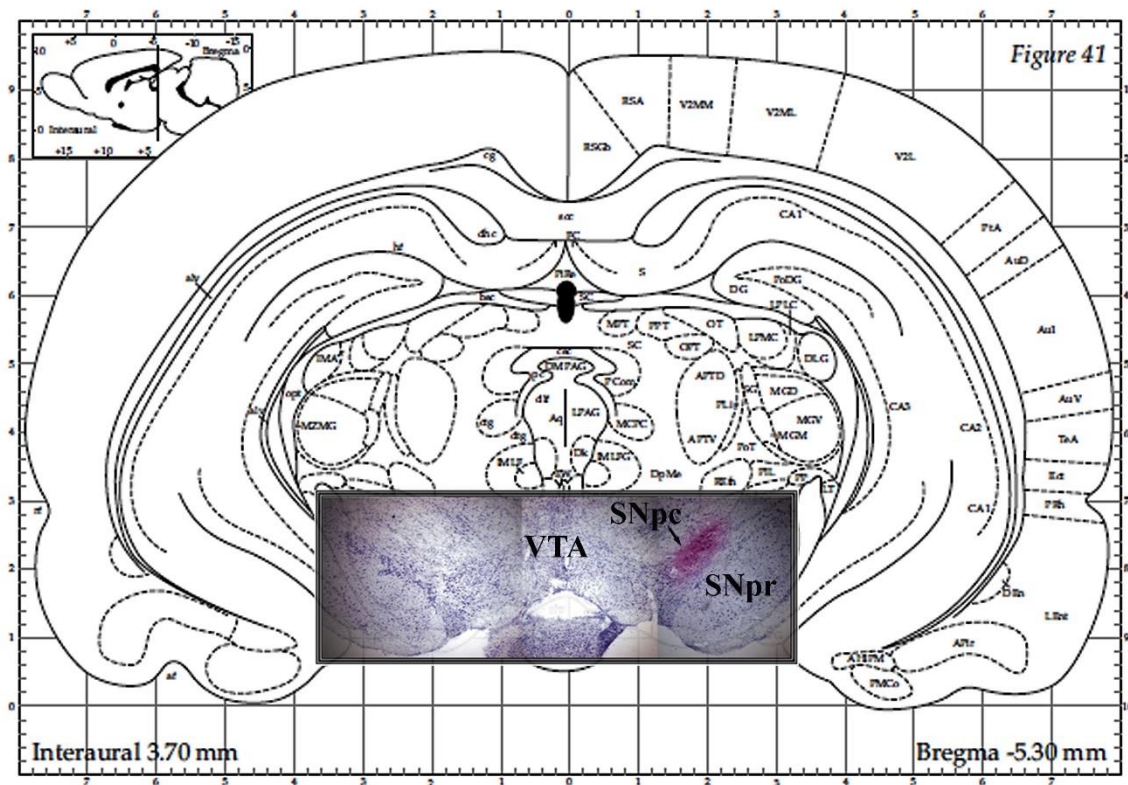


Figura 17. Sitio de inyección en la *substantia nigra pars compacta* de rata. Imagen representativa de un corte coronal al nivel del mesencéfalo del cerebro de rata, posterior a la inyección de 2 μ L de fucsina (3 mg/mL), sobrepuesta a una imagen de referencia de una sección coronal mesencefálica del cerebro de rata. La región teñida en color “fiusha” corresponde al sitio de inyección. La flecha muestra que el colorante fucsina se encuentra en la SNpc. El tejido fue teñido con violeta de cresilo. *Substantia nigra pars reticulata* (SNpr). Área ventral tegmental (VTA). La imagen de referencia fue tomada del atlas “*The Rat Brain*” (Paxinos y Watson, 1998)

6.11 Actividad del promotor NBRE3x en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de rata

La especificidad de transfección y la eficiencia de transcripción de los transgenes contenidos en las NPs de NTS-poliplex conteniendo al plásmido pNBRE3x-EGFP o pNBRE3x-hGDNF a las CMO previamente estandarizadas, fue demostrada por medio de técnicas de biología molecular e inmunohistoquímica. El ensayo de RT-PCR evidenció la transcripción específica de los mRNAs que codifican para las proteínas EGFP (Figura 18 A) y hGDNF (Figura 18 C) en la *substantia nigra* ipsilateral a la inyección de las NPs.

Los ensayos de doble inmunofluorescencia indirecta mostraron que la señal de inmunorreactividad a GFP (Figura 18 B) colocalizan en el 82 ± 6 % de las neuronas TH (+), mientras que la señal de hGDNF (Figura 18 D) colocaliza en el 90 ± 1 % de neuronas TH (+) del lado transfectado. No se observó expresión de los transgenes en la SNpc inyectada con DMEM (Figura 18 B, D y E, grupo control -).

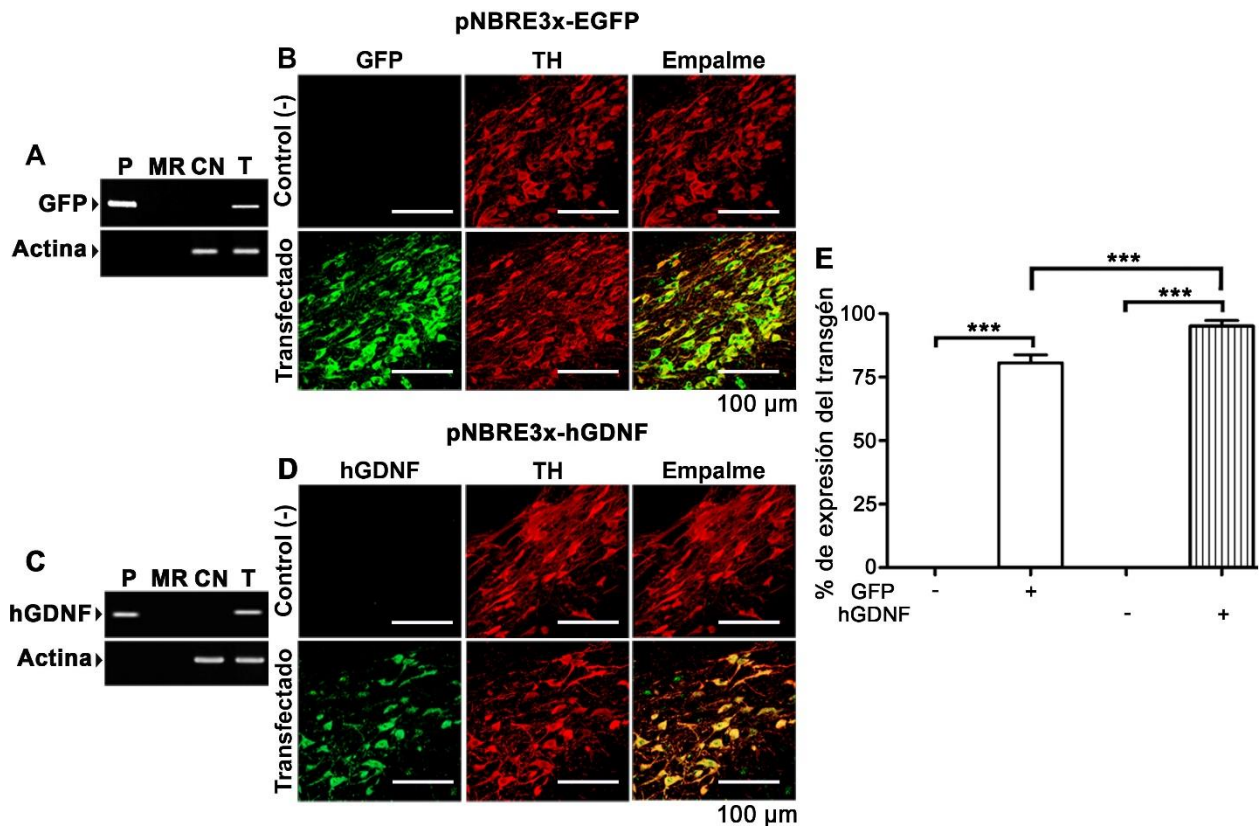


Figura 18. Expresión transgénica activada por el promotor NBRE3x en neuronas dopaminérgicas de rata. Se inyectaron NPs de NTS-poliplex conteniendo el plásmido pNBRE3x-EGFP o pNBRE3x-hGDNF en la SNpc. **A)** Fotografías representativas de un gel de agarosa después de un ensayo de RT-PCR que muestra las bandas para los amplicones de GFP (649 pb) y de actina (213 pb) en el lado transfectado con el pNBRE3x-EGFP o pNBRE3x-hGDNF (**C**). P, PCR del plásmido respectivo (control positivo); MR, mezcla de reacción de PCR sin DNAc (control negativo de la técnica); CN, control negativo (lado no transfectado); T, lado transfectado. **B)** Micrografías confocales representativas de ensayos de doble inmunofluorescencia contra GFP y TH o hGDNF y TH (**D**). Control (-), Substancia nigra inyectada con DMEM. Barra de calibración = 100 μ m. **E)** Porcentaje de transfección del GFP o hGDNF, con respecto al total de células TH (+). El conteo celular se realizó en una rebanada por rata ($n = 6$ ratas para cada condición experimental), utilizando el programa ImageJ 1.47v; Wayne Rasband, EE.UU. Análisis de ANOVA de una vía, seguida del análisis de Bonferroni; ns = no significativo; *** $P < 0.0001$.

6.12 Inducción de la expresión transgénica en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de rata

Con el objetivo de demostrar la inducibilidad de la expresión del gen de interés transferido por las NPs de NTS-poliplex a neuronas dopaminérgicas, se construyeron NPs conteniendo el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-GFP o pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF (Tabla 2) y se inyectaron en la SNpc izquierda. Se utilizaron ratas inyectadas con DMEM como grupos controles negativos de la técnica. El grupo experimental (Dox -), corresponde al grupo transfectado y sin administración con Dox. El grupo experimental (Dox +), corresponde al grupo transfectado y administradas con Dox.

Debido a que las dosis de Dox usadas en estudios previos han variado sustancialmente, elegimos evaluar la eficacia de una dosis de Dox de nivel medio para estos experimentos (Tabla 4). Los ensayos de RT-PCR e inmunofluorescencia indirecta no mostraron expresión de los RNAs y proteínas para el rtTA-Av, GFP (Figura 19, A y B) y hGDNF (Figura 20, A y B) en ratas sin transfección (grupo control). A la semana de la transfección, la SNpc de ratas con o sin administración de Dox fueron positivas para el RNAm y la proteína del rtTA-Av (Figura 19, paneles A y B y Figura 20, paneles A y B). De igual forma la administración de Dox indujo tanto la transcripción del RNAm como la traducción de la proteína GFP (Figura 19, A y B) así como también la del hGDNF (Figura 20, A y B). En los grupos controles negativos no se observó la expresión del rtTA-Av, GFP ni del hGDNF (Figuras 19 C y 20 C).

Después de la transfección del plásmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP y en ausencia o presencia de Dox, el $82 \pm 4\%$ o $79 \pm 2\%$ de las células TH (+) expresaron el rtTA-Av respectivamente (Figura 19, C), mientras que la transfección del plásmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF indujo la expresión en el $89 \pm 5\%$ de las células TH (+) en ausencia de Dox y en el $87 \pm 5\%$ de las células TH (+) en presencia de Dox (Figura 20, C). En ambos casos, no se observó inmunoreactividad contra GFP o hGDNF (Figuras 19, C y 20, C respectivamente). En contraste, el tratamiento con Dox indujo la expresión de GFP en $79 \pm 2\%$ de las células TH + (Figura 19, C) y de hGDNF en $87 \pm 5\%$ de las células TH + (Figura 20, C) a una semana postransfección.

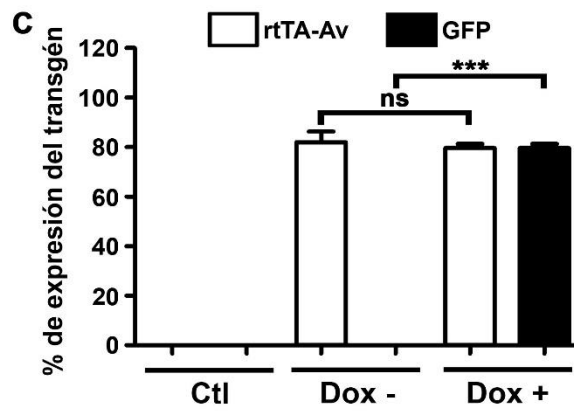
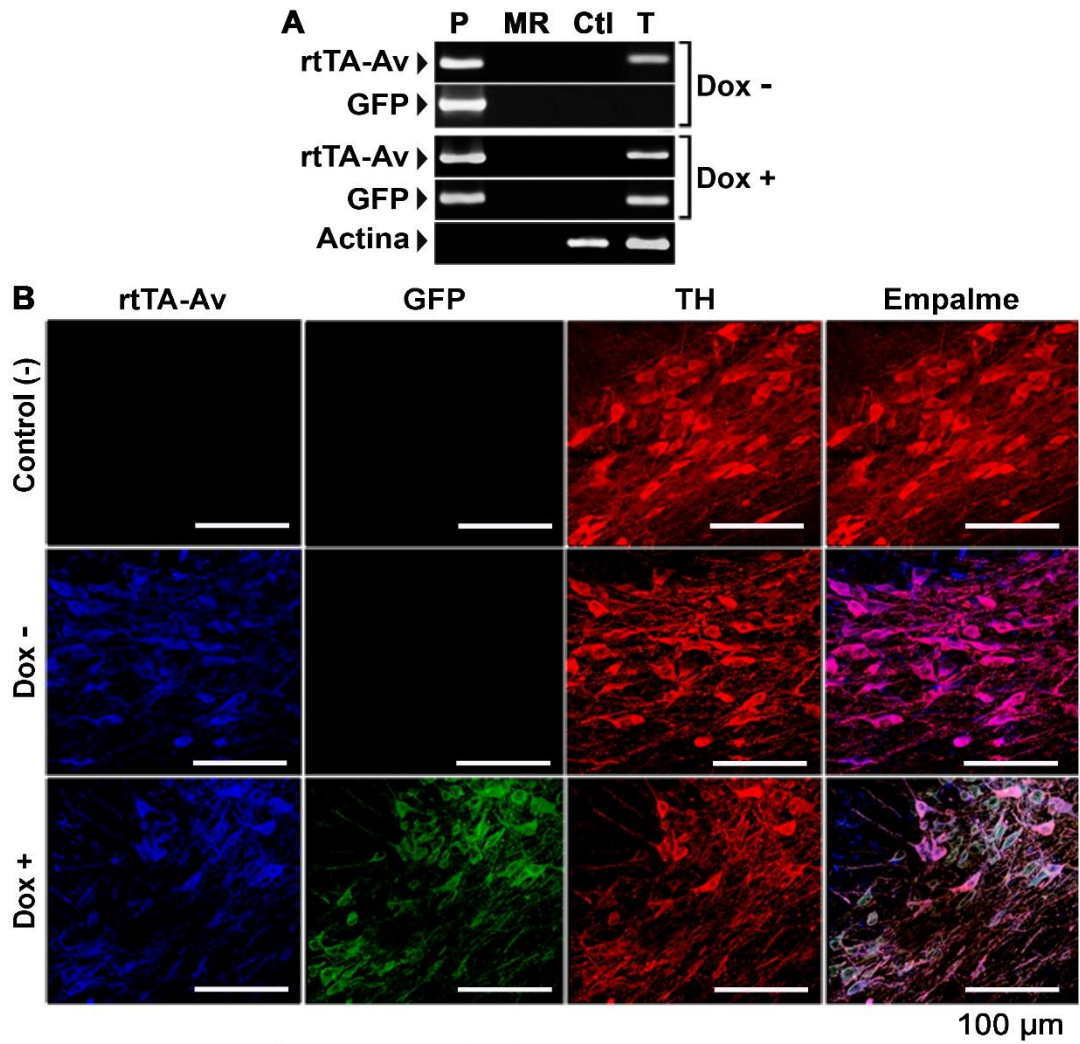


Figura 19. Actividad del plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de rata. **A)** Fotografías representativas de geles de agarosa de los productos del ensayo de RT-PCR que muestran las bandas para los amplicones de rtTA-Av (401 pb), GFP (649 pb) y actina (213 pb). P, PCR del plásmido respectivo (Control positivo); MR, mezcla de reacción de PCR sin DNAc (control negativo de la técnica); Ctl, lado no transfectado (control negativo) y T, lado transfectado. **B)** Micrografías confocales representativas del ensayo de triple inmunofluorescencia indirecta de la SNpc donde se muestra la inmunoreactividad a rtTA-Av, GFP y TH. **C)** Gráfica que muestra el porcentaje de expresión del rtTA-Av o GFP con respecto al total de células TH (+). Dox +, 20 mg/kg de doxiciclina, Dox -, ausencia de doxiciclina. Control (-) o Ctl, SNpc inyectada con DMEM. $n = 6$ ratas por cada técnica y condición experimental. El conteo celular se realizó a partir de una rebanada representativa de tejido por rata, utilizando el programa ImageJ 1.47v; Wayne Rasband, EE.UU. Análisis de ANOVA de una vía, seguido del análisis de Bonferroni; *ns* = no significativo; *** $P < 0.0001$.

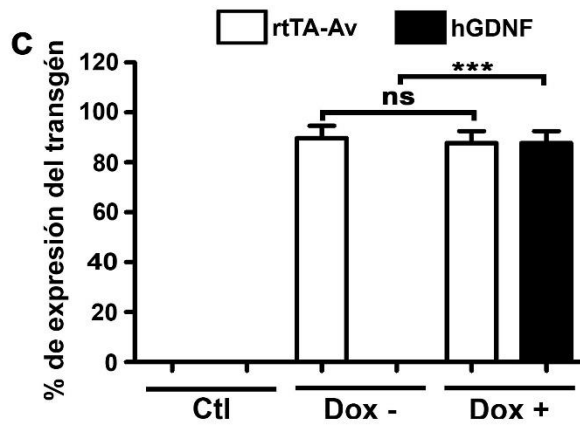
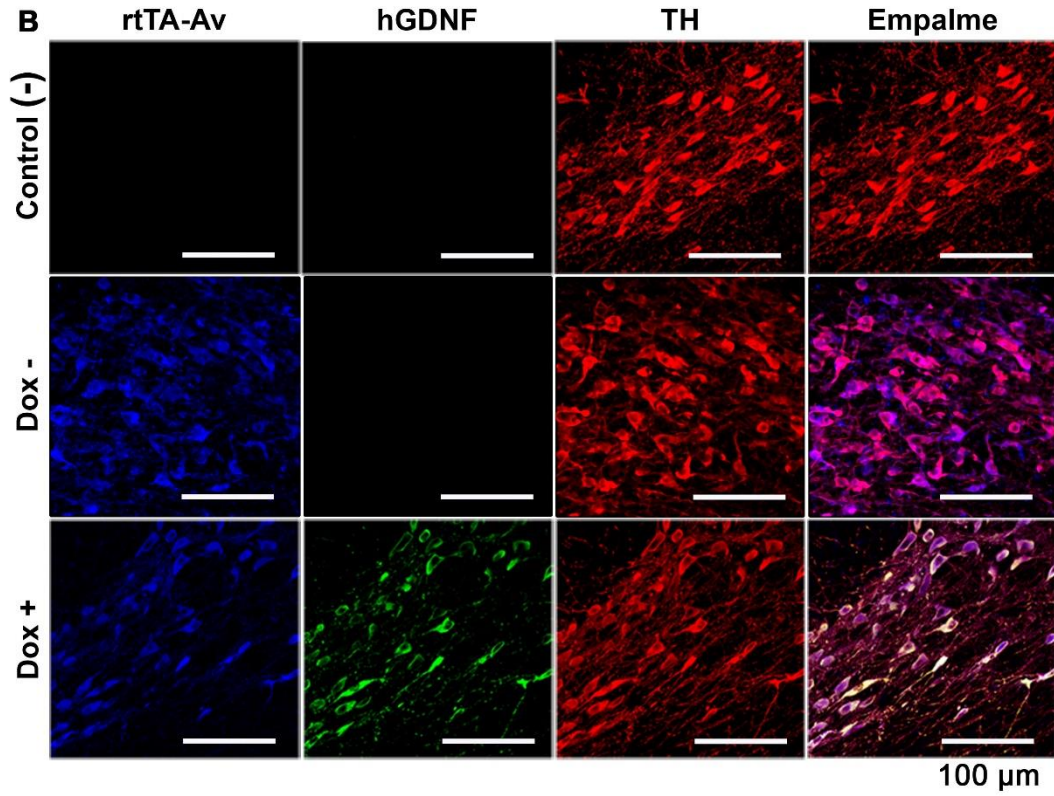
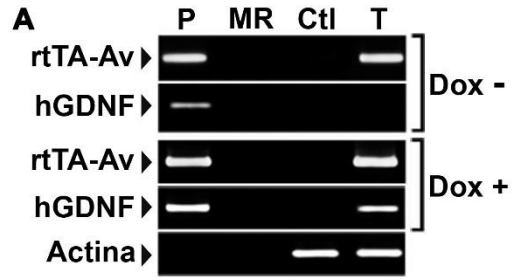


Figura 20. Actividad del plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF en las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de rata. **A)** Fotografías representativas de geles de agarosa de los productos del ensayo de RT-PCR, que muestran las bandas para los amplicones del rtTA-Av (401 pb), hGDNF (555 pb) y actina (213 pb). P, PCR del plásmido respectivo, MR, mezcla de reacción de PCR sin DNAc (control negativo de la técnica); Ctl, lado no transfectado (control negativo); T, lado transfectado. **B)** Micrografías confocales representativas del ensayo de triple inmunofluorescencia indirecta de la SNpc donde se muestra la inmunoreactividad a rtTA-Av, hGDNF y TH. **C)** Gráfica que muestra el porcentaje de expresión del rtTA-Av o hGDNF con respecto al total de células TH (+). Dox +, 20 mg/kg de doxiciclina, Dox -, ausencia de doxiciclina. Control (-) o Ctl, SNpc inyectada con DMEM. $n = 6$ ratas por cada técnica y condición experimental. El conteo celular se realizó a partir de una rebanada representativa de tejido por rata, utilizando el programa ImageJ 1.47v; Wayne Rasband, EE.UU. Análisis de ANOVA de una vía, seguido del análisis de Bonferroni; $ns =$ no significativo; *** $P < 0.0001$.

6.13 Regulación de la expresión transgénica en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* de rata

El objetivo final de este proyecto fue demostrar la capacidad de regulación de la expresión del transgén de interés fisiológico, codificado en el plásmido bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF. Para lograr este propósito, construimos NPs de NTS-poliplex conteniendo el plasmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF (ver Tabla 3) y lo inyectamos en la SNpc de rata. Se conformaron grupos de controles negativos los cuales fueron inyectados con DMEM (Ctl o Control -).

La regulación de la expresión del transgen hGDNF, fue evaluada a tres semanas postransfección intranigral. Al grupo experimental transfectado y administrado con Dox durante la primera semana de estudio, se le denominó estado “On”. Al grupo experimental transfectado, administrado con Dox durante la primera semana y sin Dox durante la segunda semana, se les denominó estado “On-Off”. Al grupo experimental transfectado y tratado con Dox durante la primer y tercer semana postransfección y sin administración de Dox durante la segunda semana de estudio, se les denominó como estado “On-Off-On”.

Debido a que tres dosis semanales de Dox (20 mg/kg de peso corporal) no permitieron la regulación de la expresión del transgén (no se consiguió el silenciamiento de la expresión del transgén en el grupo Off), se optimizó la administración de Dox a dosis única semanal de 5 mg/kg de peso corporal por semana (1.25 mg), ver Tabla 4. La optimización de la dosis de Dox se justificó como se describe a continuación “Para activar al sistema Tet-On o Tet-On Avanzado en el cerebro, se han administrado dos regímenes de tratamiento de Dox intraperitoneal (ip) u oralmente a través de agua de beber o alimentos, en un rango muy amplio 1 a 66 mg/día (Tabla 4). La administración de fármacos vía i.p. asegura una dosificación precisa y exacta en los animales, mientras que la administración oral a través de agua de beber o en el alimento, está sujeta al consumo voluntario del material, lo que da lugar a una variabilidad en la concentración del fármaco en el plasma sanguíneo por animal. Por consiguiente, se decidió utilizar 20 mg/kg de peso corporal, i.p., que corresponde a la mitad de la dosis mínima total (30,8 mg administrada en tres dosis de 5 mg/día) utilizada para el sistema Tet-On original (Tabla 4)”.

Tabla 4. Dosis de Dox administrada utilizando el sistema Tet-On en el sistema nervioso central

Animal	Vía de administración	Dosis reportada	Dosis calculada (mg/día)	Dosis total calculada (mg)	Referencia
Rata	Agua de beber	3 mg/mL por 10 días	66	660	[83]
Rata	Agua de beber	1 mg/mL por 3 dosis semanales	44	132	[117]
Rata	Agua de beber	0.2 mg/mL por 7 días	4.4	30.8	[118]
* Rata	ip	1 mg/día por 4 días	1	4	[119]
* Ratón	Alimento	6 mg/g por 11 días	27	297	[120]
* Rata (Dosis usada para inducer la expresión del transgén)	ip	20 mg/kg por 3 dosis semanales	5	15	
* Rata (Dosis usada para regular la expresión del transgén)	ip	5 mg/kg por 1 dosis semanal	1.25	1.25	

* Sistema Tet-On Avanzado

Base para calcular la dosis total en rata: 1) El consumo de agua en rata cada 24 h es de 10 a 12 mL por 100 g de peso corporal. (Patrich E. Sharp, The laboratory Rat. 1998. CRC, USA). 2) El peso corporal medio de rata Wistar adulta es de 200 g.

Base para calcular la dosis total en ratón: El consumo de alimento en ratón cada 24 h es de 4,5 g por 30 g de peso corporal. (Mark A. Suckow, The laboratory Mouse, 2001. CRC, USA).

Los niveles de transcripción de los genes rtTA-Av y hGDNF se cuantificaron por la técnica de RT-qPCR cada semana durante tres semanas, después de la transfección nigral.

Los niveles de transcripción del RNAm del rtTA-Av fueron similares en las substancias nigras transfectadas después del tratamiento con Dox (grupos; On y On-Off-On) y después de la suspensión del tratamiento con Dox (grupo On-Off) (Figura 21, A). Los niveles de RNAm de hGDNF fueron similares en los grupos experimentales On y On-Off-On y se redujeron significativamente en $88 \pm 1\%$ en el estado On-Off (Figura 21, A). De acuerdo con los resultados de RT-qPCR, las células TH (+) que expresan el rtTA-Av (Figura 19, C) fue del $84 \pm 4\%$ (On), $94 \pm 4\%$ (On-Off) y $86 \pm 3\%$ (On-Off-On), mientras que el hGDNF colocalizó con el $85 \pm 4\%$ (On) y $87 \pm 3\%$ (On-Off-On) de células TH (+) (Figura 21, C). No se detectó expresión del hGDNF tanto en el estado On-Off como en los animales no transfectados (Figura 21, C).

También se exploró si la Dox (5 mg/kg de peso corporal, i.p., por semana durante dos semanas) podría ejercer un efecto neuroprotector en las neuronas dopaminérgicas [121] a través de la expresión endógena de GDNF (rGDNF). El soporte adicional para la Figura 21 se muestra en la Figura 22. Se mostró que la Dox no aumentó la expresión basal de rGDNF, al compararla con el grupo control de ratas no tratadas con Dox (Figura 22, A). Finalmente, se exploró la expresión génica del gen de la metaloproteinasa de matriz extracelular tipo 3 (MMP-3), con el objetivo de descartar un posible efecto deletéreo provocado por la Dox en las neuronas dopaminérgicas, mediante la inyección nigral de lipopolisacárido (LPS; 5 $\mu\text{g}/2 \mu\text{L}$) como control positivo de daño celular [122]. Contrariamente a LPS, la administración de Dox no cambió significativamente la expresión basal de MMP-3 (Figura 22, B).

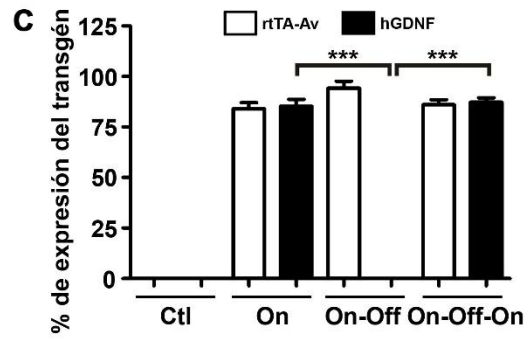
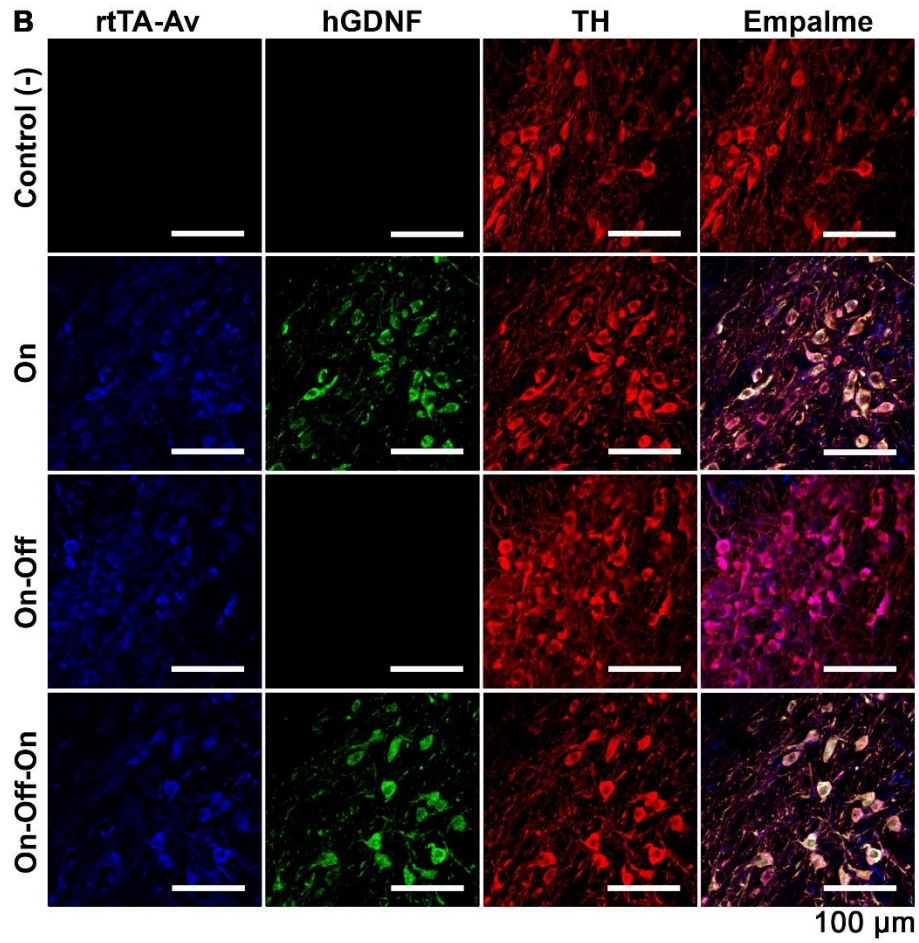
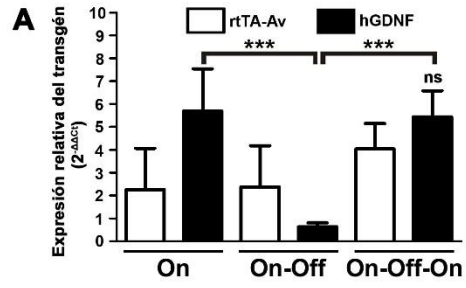


Figura 21. Regulación de la expresión de hGDNF en neuronas dopaminérgicas nigrales transfectadas con el plásmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF. **A)** Niveles de expresión de los genes rtTA-Av y hGDNF mediante la técnica de RT-qPCR. **B)** Micrografías confocales representativas de triple inmunofluorescencia contra rtTA-Av, hGDNF y TH. **C)** Gráfico que muestra el porcentaje de expresión de rtTA-Av o hGDNF con respecto al total de células TH (+). Control (-) o Ctl, SNpc inyectada con DMEM. Grupos experimentales On y On-Off-On, tratamiento con Dox (5 mg/kg de peso corporal, i.p.). Retirada de Dox, grupo experimental On-Off. $n = 6$ ratas por cada técnica y condición experimental. El conteo celular se realizó a partir de una rebanada representativa de tejido por rata, utilizando el programa Image J 1.47v; Wayne Rasband, EE.UU. Análisis de ANOVA de una vía, seguido del análisis de Bonferroni. *ns* = no significativo; *** $P < 0.0001$.

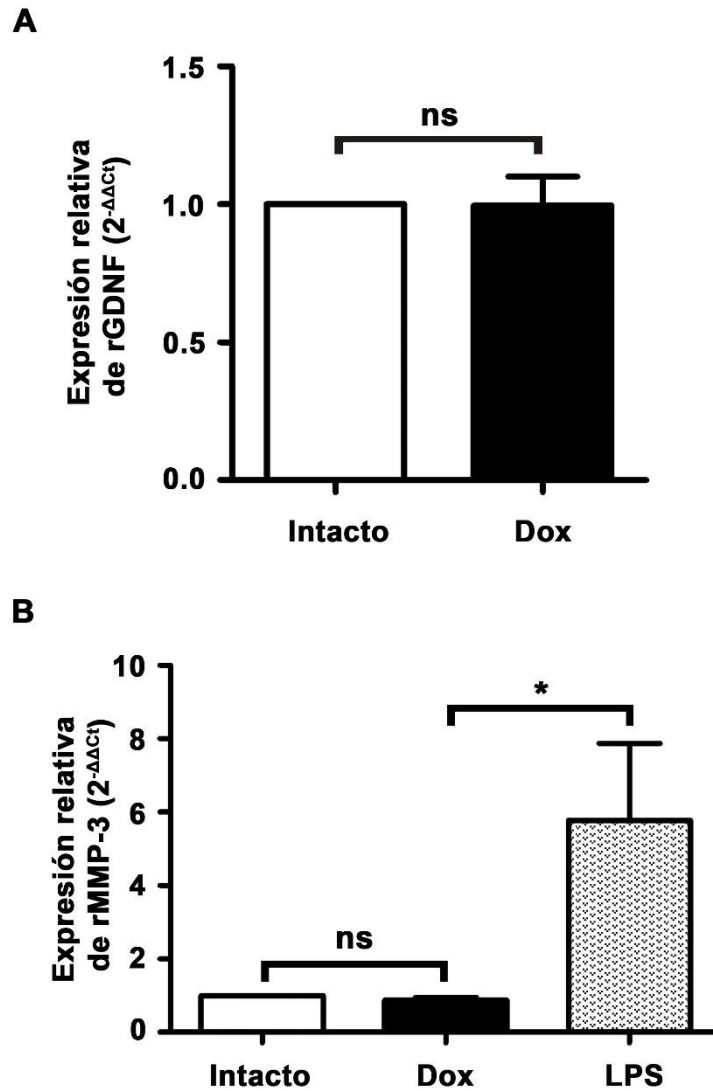


Figura 22. La doxiciclina no induce efectos neurotróficos o deletéreos sobre las neuronas dopaminérgicas. Los gráficos muestran la razón de cambio de los niveles de transcripción del GDNF endógena de rata (**A**) y MMP-3 de rata (**B**), evaluados por RT-qPCR. La Doxiciclina (5 mg/kg de peso corporal en solución salina; i.p.) se administró una vez por semana durante 2 semanas. El LPS (5 μ g/2 μ L en solución salina) se inyectó estereotáxicamente en el SNpc y las muestras de tejido fueron tomadas 2 horas después de la inyección. Los valores se expresan como la media \pm SE; $n = 6$ animales por grupo. * $P < 0.01$ en comparación con la muestra intacta. Análisis de ANOVA de una vía, seguido del análisis de Bonferroni o análisis de t pareada, para los transcritos de GDNF endógeno de rata. *ns* = no significativo.

7. Discusión

El presente trabajo introdujo una ventaja adicional a las NPs de NTS-poliplex, sin precedentes en el campo de la transferencia génica al cerebro por nanovectores sintéticos. Los resultados presentados en éste, ofrecen un sistema de NPs de NTS-polyplex mejorado que permite la regulación de la expresión del transgén en las neuronas dopaminérgicas nigrales.

La disminución en el tamaño del DNAp mediante la inclusión de un promotor mínimo del hDAT (promotor NBRE3x) permitió la incorporación de los componentes reguladores clave (rtTA-Av y TRE) del sistema Tet-On Avanzado en un solo plásmido que contiene el transgén de interés terapéutico (plásmido bifuncional).

El potencial zeta, es el valor de la intensidad del campo eléctrico estático de la capa externa entre la partícula y su fluido, que es útil para evaluar el grado de estabilidad de las partículas. Los valores de potencial zeta entre + 30 y - 30 mV, predicen problemas en la estabilidad de la dispersión (tendencia de aglomeración de las partículas), a valores de pH entre 4 y 7.5 [123]. Los valores del potencial zeta de las NPs de NTS-poliplex, conteniendo los plásmidos bifuncionales, fueron de + 22.6 y + 30.9 mV a pH neutro, por lo que teóricamente, sugiere que tienen tendencia a la inestabilidad. Sin embargo, las NPs de NTS-poliplex presentaron un buen grado de eficiencia de transfección, como lo sugieren nuestros resultados de transfección *in vitro* e *in vivo*.

Tanto los ensayos de microscopia electrónica de barrido (método cualitativo) como los ensayos de dispersión de luz dinámica (método cuantitativo), permitieron evaluar el diámetro de las NPs de NTS-poliplex, construidas con los plásmidos regulados por Dox. El método cualitativo sugirió, que el diámetro promedio de las NPs evaluadas es de aproximadamente 80 nm, mientras que el método cuantitativo sugirió que el diámetro promedio de éstas es de 180 nm.

Esta diferencia en el valor de las mediciones, puede deberse a que en el método cuantitativo se evalúa la totalidad de la suspensión de NPs y no discrimina a las posibles NPs aglomeradas en la suspensión, calculando así el diámetro promedio de éstas.

El tamaño de las NPs de NTS-poliplex que contienen al plásmido regulado por Dox puede caber en el espacio endosomal, el cual, tiene un diámetro promedio de 500 nm [124] y es aceptable para avanzar a través del complejo de poro nuclear que tiene un diámetro de 125 nm [125], explicando así el aumento de la eficiencia de transfección *in vitro* y la alta eficiencia de transfección (> 80 %) en las neuronas dopaminérgicas nigrales. Este hallazgo correlaciona con un estudio reciente, donde se ha reportado alta eficiencia de transfección de las neuronas dopaminérgicas nigrales mediante las NPs de NTS-poliplex, incluso si éstas han sido lesionadas con 6-OHDA [44], lo que puede explicar el éxito de la terapia génica neurotrófica basada en el uso de las NPs de NTS-poliplex.

Estudios previos han demostrado que Nurr1 induce la actividad transcripcional del promotor NBRE3x *in vitro* [95]. La participación de Nurr1 en la activación del promotor NBRE3x es apoyada por los resultados obtenidos en cultivos de células N1E-115-Nurr1 transfectadas con las NPs de NTS-poliplex, conteniendo el plásmido pNBRE3x-hGDNF o pNBRE3x-EGFP. Además, los resultados obtenidos por las técnicas de RT-PCR e inmunofluorescencia indirecta, confirmaron la presencia de Nurr1 en las neuronas dopaminérgicas nigrales, y correlacionan con los reportes hechos por otros autores [95,126]. Más aún, los resultados funcionales *in vivo* muestran que los niveles endógenos de Nurr1, en la SNpc de rata, son suficientes para activar la expresión de hGDNF y GFP, que se encuentran bajo el control transcripcional del promotor NBRE3x. Además, se ha reportado que la expresión de Nurr1 en las neuronas dopaminérgicas en edad adulta, es necesaria para mantener su fenotipo [95,126]. Otro estudio reciente reportó que el promotor NBRE3x es capaz de conducir la expresión de CDNF (factor neurotrófico de dopamina cerebral) en neuronas dopaminérgicas de la SNpc, previamente lesionadas con 6-OHDA, sugiriendo que los niveles endógenos de Nurr1 son suficientes para activar al promotor NBRE3x en el modelo animal de la EP [101]. En adición, en la clona celular N1E-115-Nurr1, que se obtuvo mediante la transfección transitoria del gen que codifica para Nurr1, se observó que aproximadamente el 45 % de éstas expresaron Nurr1 (Figura 7). Este porcentaje de expresión fue suficiente para envaluar la actividad del promotor NBRE3x *in vitro*, contenido en los plásmidos control de expresión (pNBRE3x-EGFP y pNBRE3x-hGDNF), así como en los plásmidos bifuncionales.

Se encontró que la eficiencia de transfección utilizando un solo plásmido (4635 pb) que contiene un gen reportero bajo el control transcripcional del promotor NBRE3x en la clona celular N1E-115-Nurr1, fue similar a la conducida por el promotor CMV, en cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas transfectadas con las NPs de NTS-poliplex [39]. Sin embargo, la eficacia de transfección del plásmido GFP bajo el control transcripcional de un promotor más grande hDAT (10,405 pb) fue significativamente menor (datos no mostrados) que la eficiencia obtenida del promotor NBRE3x *in vitro*. Además, se ha reportado que la transfección de neuronas dopaminérgicas de cultivo primario, usando plásmidos mayores de 11 kpb no sólo disminuye la eficiencia de transfección, sino que también puede producir daño celular, probablemente debido a las altas concentraciones molares del acarreador de NTS (mayor a 250 nM), necesarias para compactar al ADNp [39]. La disminución de la eficiencia de la transfección debido al gran tamaño del DNA también se produce en otros vectores no virales [84,127], particularmente, en vectores virales que tienen una capacidad limitada de empaquetamiento del material genético [85]. El alto porcentaje de expresión transgénica (> 80 %) en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc inmunoractivas a TH, se debe también, a la disminución del tamaño de los plásmidos que contienen el promotor NBRE3x (pNBRE3x-EGFP, pNBRE3x-hGDNF, y bifuncionales).

En concordancia con estudios previos [80,128], las NPs de NTS-poliplex también tienen la capacidad de transfectar los dos plásmidos del sistema Tet-On Avanzado original (sistema de regulación dual) que codifica para hGDNF o GFP, a la misma célula. En este sistema, se requiere que los dos plásmidos estén presentes en las mismas células. Tal requisito se convierte en una limitante, debido a que eventualmente las células diana de transfección, no reciben los dos plásmidos que integran al sistema de regulación, disminuyendo así la eficiencia de la transfección. Interesantemente, la eficiencia de transfección del sistema Tet-On Avanzado original (sistema regulable dual), fue significativamente superada por los plásmidos bifuncionales, al observarse un incremento en la eficiencia de expresión de los transgenes GFP o hGDNF, mayor a 2.5 veces, comparado con la eficiencia de expresión de estos mismos transgenes utilizando el sistema regulable dual, en los estudios *in vitro*.

La transfección del sistema regulable bifuncional condujo a la expresión del transgén (hGDNF o GFP) cuando se administró Dox a los cultivos de células N1E-115-Nurr1. Estos resultados demuestran que la actividad del promotor NBRE3x causa la expresión del rtTA-Av, y éste a su vez activa la secuencia TRE en presencia de Dox. Mientras que en ausencia de Dox no se observa expresión basal del transgén, este resultado confirma que no existe "fuga transcripcional" del sistema de regulación Tet-On Avanzado [80]. Interesantemente, se observó que la presencia celular de la inmunorreactividad a hGDNF fue menor que la de GFP en células N1E-115-Nurr1 (Figuras 15 y 17). Esta observación podría explicarse parcialmente, debido a que la proteína hGDNF tiene la capacidad de ser liberada al medio de cultivo [116]. Esta sugerencia es apoyada por el análisis de microscopía confocal que mostró la co-localización de la proteína hGDNF con Golgin-97, una proteína del aparato de Golgi [129], sugiriendo que el hGDNF expresado *in vitro*, se libera al medio de cultivo, observándose menos células que expresan hGDNF citosólico. En otra instancia, nuestros resultados funcionales *in vitro* apoyan los resultados de restricción enzimática y de secuenciación (datos no mostrados) que evidencian la exactitud estructural de los plásmidos bifuncionales desarrollados en este trabajo.

Nuestros resultados *in vivo* demostraron que las NPs de NTS-poliplex que contienen el plásmido regulado por Dox (GFP o hGDNF), mantienen la especificidad de expresión tejido específica en neuronas DA, mejorando la regulación de la expresión de transgenes, ya que la expresión de hGDNF se produjo solamente en neuronas dopaminérgicas bajo la inducción consecutiva a la administración de Dox y posteriormente silenciada al momento de retirar la administración de Dox. Esta característica se puede explicar por el hallazgo de que el rtTA-Av se expresó constitutivamente sólo en las neuronas dopaminérgicas, lo que sugiere que el complejo Dox-rtTA-Av se formó y se unió a la secuencia TRE para activar la transcripción transgénica cuando se administró la Dox y que el complejo se desensambló cuando el tratamiento de Dox se suspendió, como ocurre también en el sistema Tet-On original [73]. La inducción de la expresión de hGDNF y GFP, así como la regulación de la expresión del gen terapéutico hGDNF en ratas normales muestra la prueba de principio, pero esta innovación tendrá un impacto importante en modelos animales de la EP para regular la expresión del gen hGDNF u otros genes neurotróficos tales como BDNF [44,45], NTRN [130] y CDNF [101], que al igual que el hGDNF, son fuertes candidatos para ser usados en la terapia génica para la EP.

En otra instancia, la dosis única de Dox (5 mg/kg de peso corporal) administrada en ratas, usada para regular la expresión de hGDNF, sugiere que Dox no presenta ningún efecto neurotrófico. Además, esta dosis no es deletérea para las neuronas dopaminérgicas, en comparación con el efecto neuroprotector observado por la administración de dosis más altas de Dox reportada en un estudio previo [121].

Este trabajo es el primero en lograr la regulación de la expresión transgénica específicamente en las neuronas dopaminérgicas nigrales, incluyendo estudios previos que han utilizado vectores virales.

8. Conclusiones

El presente trabajo ofrece un desarrollo de innovación nanobiotecnológica del sistema de NPs de NTS-poliplex para regular la expresión transgénica en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Nuestra estrategia fue incluir un elemento de especificidad (promotor NBRE3x) y los dos elementos de regulación de la expresión génica (rtTA-Av y TRE) controlados por doxiciclina. Esta misma estrategia se puede aplicar en la nanoterapia suicida para el tratamiento del cáncer. En este caso se utilizarían promotores específicos de tumores tales como los promotores de mucina-1 [131], NCX [132] y E2F-1 [133], por mencionar algunos.

Este trabajo es el primero en demostrar la actividad de un promotor mínimo artificial (promotor NBRE3x), específico para neuronas dopaminérgicas nigrales, sin perder su propiedad de dirigir la expresión del transgén de interés.

El uso del promotor NBRE3x redujo el tamaño molecular del ADNp, para incluir las secuencias reguladoras clave del sistema regulable Tet-On avanzado en un solo plásmido. Esta estrategia de ingeniería molecular, permitió conservar la alta eficiencia de transfección que ofrecen las NPs de NTS-poliplex cuando son construídas con un solo plásmido.

Las NPs de NTS-poliplex construídas con el plásmido bifuncional, condujeron a la expresión del gen de interés, únicamente cuando se administró Dox, sin producir expresión basal del transgén.

El sistema de NPs de NTS-poliplex adquiere ahora un nuevo elemento más de regulación transgénica *in vivo*, es el primer sistema de transferencia génica capaz de producir niveles efectivos y seguros de transgenes terapéuticos de manera específica en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

Por el momento, el presente desarrollo de innovación biotecnológica ofrece una aplicación promisoría para la nanoterapia neurotrófica de la Enfermedad de Parkinson.

9. Perspectivas

Las propiedades físicas de las NPs de NTS-poliplex sugirieron un amplio rango del diámetro de éstas, lo cual puede deberse al uso de PLL polidispersa en la síntesis del acarreador de NTS. Por lo tanto, la disminución de la polidispersidad de la PLL, usada para sistematizar el acarreador de NTS, representa una oportunidad de mejora del sistema de NPs de NTS-poliplex. El resultado final, puede reflejarse en el aumento de la eficiencia de transfección, al obtener NPs más homogéneas en el rango no mayor de 100 nm.

Los valores de potencial zeta de las NPs de NTS-poliplex en suspensión, sugirieron que tienen a la inestabilidad. Por lo tanto, otra oportunidad de mejorar al sistema de NPs de NTS-poliplex se enfoca en estabilizarlas en su forma farmacéutica, con el objetivo de optimizar los costos de su aplicación, al aumentar su vida de anaquel.

Contabilizar a las NPs de NTS-poliplex en suspensión, también representa una oportunidad de mejorar la eficiencia de transfección, ya que se podría optimizar el número de NPs que se administran en protocolos de terapia génica.

La ausencia en la expresión basal del transgén de interés, observada en el nuevo sistema de NPs de NTS-poliplex regulado por doxiciclina, representa una gran ventaja para ser usada en estrategias experimentales para inducir o regular la expresión del transgén de manera temporal, en estudios *in vitro* o *in vivo*.

A la fecha, se han realizado avances en el estudio de la aplicación del nuevo sistema de NPs de NTS-poliplex, conteniendo el plásmido bifuncional, que codifica para hGDNF, en un modelo animal de hemiparkinsonismo crónico.

10. Bibliografía

1. Aron L, Klein R (2011) Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 34: 88-100.
2. El Médico Interactivo (2003). Cuadro clínico de la enfermedad de Parkinson y síndromes parkinsonianos-plus. En, *Enfermedad de Parkinson*. 892. Diario Electrónico de la Sanidad. Recuperado de <http://formaciones.elmedicointeractivo.com/emiold/aula2001/tema9/parkinson4.php>.
3. Nutt JG, Wooten GF (2005) Clinical practice. Diagnosis and initial management of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 353: 1021-1027.
4. von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Botzel K, Sampaio C, et al. (2005) Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 15: 473-490.
5. Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373: 2055-2066.
6. Malkki H (2013) Parkinson disease: Nonmotor symptoms predict quality of life in patients with early Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 9: 544.
7. Alvarez-Maya I, Navarro-Quiroga I, Meraz-Rios MA, Aceves J, Martinez-Fong D (2001) In vivo gene transfer to dopamine neurons of rat substantia nigra via the high-affinity neurotensin receptor. *Mol Med* 7: 186-192.
8. Lee CR, Tepper JM (2009) Basal ganglia control of substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neural Transm Suppl*: 71-90.
9. Martinez-Fong D, Bannon MJ, Trudeau LE, Gonzalez-Barrios JA, Arango-Rodriguez ML, et al. (2012) NTS-Polyplex: a potential nanocarrier for neurotrophic therapy of Parkinson's disease. *Nanomedicine* 8: 1052-1069.
10. Krack P, Hariz MI (2010) Parkinson disease: deep brain stimulation in Parkinson disease-what went wrong? *Nat Rev Neurol* 6: 535-536.
11. Shulman JM, De Jager PL, Feany MB (2011) Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 6: 193-222.
12. Connolly BS, Lang AE (2014) Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA* 311: 1670-1683.
13. Finlay CJ, Duty S, Vernon AC (2014) Brain morphometry and the neurobiology of levodopa-induced dyskinesias: current knowledge and future potential for translational pre-clinical neuroimaging studies. *Front Neurol* 5: 95.

14. Ossig C, Reichmann H (2013) Treatment of Parkinson's disease in the advanced stage. *J Neural Transm* 120: 523-529.
15. Jeste DV, Wyatt RJ (1981) Dogma disputed: is tardive dyskinesia due to postsynaptic dopamine receptor supersensitivity? *J Clin Psychiatry* 42: 455-457.
16. Medline Plus (2017). Discinesia tardía. Recuperado de <https://medlineplus.gov/ency/article/000685.htm>.
17. Castrioto A, Lhomme E, Moro E, Krack P (2014) Mood and behavioural effects of subthalamic stimulation in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 13: 287-305.
18. Fasano A, Daniele A, Albanese A (2012) Treatment of motor and non-motor features of Parkinson's disease with deep brain stimulation. *Lancet Neurol* 11: 429-442.
19. Stayte S, Vissel B (2014) Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease. *Front Neurosci* 8: 113.
20. Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, Shizuma N, Kawasaki K, et al. (2002) Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum Gene Ther* 13: 345-354.
21. Sun M, Kong L, Wang X, Holmes C, Gao Q, et al. (2004) Coexpression of tyrosine hydroxylase, GTP cyclohydrolase I, aromatic amino acid decarboxylase, and vesicular monoamine transporter 2 from a helper virus-free herpes simplex virus type 1 vector supports high-level, long-term biochemical and behavioral correction of a rat model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 15: 1177-1196.
22. Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, et al. (2007) Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 369: 2097-2105.
23. Wang Z, Tapscott SJ, Chamberlain JS, Storb R (2011) Immunity and AAV-Mediated Gene Therapy for Muscular Dystrophies in Large Animal Models and Human Trials. *Front Microbiol* 2: 201.
24. Zaiss AK, Muruve DA (2008) Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther* 15: 808-816.
25. Bjorklund T, Kirik D (2009) Scientific rationale for the development of gene therapy strategies for Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792: 703-713.
26. Kordower JH, Bjorklund A (2013) Trophic factor gene therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord* 28: 96-109.

27. Oiwa Y, Nakai K, Itakura T (2006) Histological effects of intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease model macaque monkeys. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 46: 267-275; discussion 275-266.
28. Yasuda T, Mochizuki H (2010) Use of growth factors for the treatment of Parkinson's disease. *Expert Rev Neurother* 10: 915-924.
29. Slevin JT, Gash DM, Smith CD, Gerhardt GA, Kryscio R, et al. (2007) Unilateral intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: response to 1 year of treatment and 1 year of withdrawal. *J Neurosurg* 106: 614-620.
30. Bartus RT (2012) Translating the therapeutic potential of neurotrophic factors to clinical 'proof of concept': a personal saga achieving a career-long quest. *Neurobiol Dis* 48: 153-178.
31. Marks WJ, Jr., Bartus RT, Siffert J, Davis CS, Lozano A, et al. (2010) Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol* 9: 1164-1172.
32. Bartus RT, Herzog CD, Chu Y, Wilson A, Brown L, et al. (2011) Bioactivity of AAV2-neurturin gene therapy (CERE-120): differences between Parkinson's disease and nonhuman primate brains. *Mov Disord* 26: 27-36.
33. Herzog CD, Brown L, Kruegel BR, Wilson A, Tansey MG, et al. (2013) Enhanced neurotrophic distribution, cell signaling and neuroprotection following substantia nigral versus striatal delivery of AAV2-NRTN (CERE-120). *Neurobiol Dis* 58: 38-48.
34. Kordower JH, Herzog CD, Dass B, Bakay RA, Stansell J, 3rd, et al. (2006) Delivery of neurturin by AAV2 (CERE-120)-mediated gene transfer provides structural and functional neuroprotection and neurorestoration in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 60: 706-715.
35. Bartus RT, Weinberg MS, Samulski RJ (2014) Parkinson's disease gene therapy: success by design meets failure by efficacy. *Mol Ther* 22: 487-497.
36. Huang R, Ke W, Han L, Liu Y, Shao K, et al. (2010) Lactoferrin-modified nanoparticles could mediate efficient gene delivery to the brain in vivo. *Brain Res Bull* 81: 600-604.
37. Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I (2000) Synthesis of a non-viral vector for gene transfer via the high-affinity neurotensin receptor. *Brain Res Brain Res Protoc* 6: 13-24.
38. Gonzalez-Barrios JA, Lindahl M, Bannon MJ, Anaya-Martinez V, Flores G, et al. (2006) Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Mol Ther* 14: 857-865.
39. Hernandez-Baltazar D, Martinez-Fong D, Trudeau LE (2012) Optimizing NTS-polyplex as a tool for gene transfer to cultured dopamine neurons. *PLoS One* 7: e51341.

40. Navarro-Quiroga I, Antonio Gonzalez-Barrios J, Barron-Moreno F, Gonzalez-Bernal V, Martinez-Arguelles DB, et al. (2002) Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal. *Brain Res Mol Brain Res* 105: 86-97.
41. Castillo-Rodriguez RA, Arango-Rodriguez ML, Escobedo L, Hernandez-Baltazar D, Gompel A, et al. (2014) Suicide HSVtk Gene Delivery by Neurotensin-Polyplex Nanoparticles via the Bloodstream and GCV Treatment Specifically Inhibit the Growth of Human MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Tumors Xenografted in Athymic Mice. *PLoS One* 9: e97151.
42. Martinez-Fong D, Navarro-Quiroga I, Ochoa I, Alvarez-Maya I, Meraz MA, et al. (1999) Neurotensin-SPDP-poly-L-lysine conjugate: a nonviral vector for targeted gene delivery to neural cells. *Brain Res Mol Brain Res* 69: 249-262.
43. Rubio-Zapata HA, Rembao-Bojorquez JD, Arango-Rodriguez ML, Dupouy S, Forgez P, et al. (2009) NT-polyplex: a new tool for therapeutic gene delivery to neuroblastoma tumors. *Cancer Gene Ther* 16: 573-584.
44. Hernandez-Chan NG, Bannon MJ, Orozco-Barrios CE, Escobedo L, Zamudio S, et al. (2015) Neurotensin-polyplex-mediated brain-derived neurotrophic factor gene delivery into nigral dopamine neurons prevents nigrostriatal degeneration in a rat model of early Parkinson's disease. *J Biomed Sci* 22: 59.
45. Razgado-Hernandez LF, Espadas-Alvarez AJ, Reyna-Velazquez P, Sierra-Sanchez A, Anaya-Martinez V, et al. (2015) The transfection of BDNF to dopamine neurons potentiates the effect of dopamine d3 receptor agonist recovering the striatal innervation, dendritic spines and motor behavior in an aged rat model of Parkinson's disease. *PLoS One* 10: e0117391.
46. Arango-Rodriguez ML, Navarro-Quiroga I, Gonzalez-Barrios JA, Martinez-Arguelles DB, Bannon MJ, et al. (2006) Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochim Biophys Acta* 1760: 1009-1020.
47. Hernandez ME, Rembao JD, Hernandez-Baltazar D, Castillo-Rodriguez RA, Tellez-Lopez VM, et al. (2014) Safety of the intravenous administration of neurotensin-polyplex nanoparticles in BALB/c mice. *Nanomedicine* 10: 745-754.
48. Palacios JM, Kuhar MJ (1981) Neurotensin receptors are located on dopamine-containing neurones in rat midbrain. *Nature* 294: 587-589.
49. Beaudet A, Dournaud P, Boudin H (1998) Complementarity of radioautographic and immunohistochemical techniques for localizing neuroreceptors at the light and electron microscopy level. *Braz J Med Biol Res* 31: 215-223.

50. Boudin H, Pelaprat D, Rostene W, Pickel VM, Beaudet A (1998) Correlative ultrastructural distribution of neurotensin receptor proteins and binding sites in the rat substantia nigra. *J Neurosci* 18: 8473-8484.
51. Mendez M, Souza F, Nagano M, Kelly PA, Rostene W, et al. (1997) High affinity neurotensin receptor mRNA distribution in rat brain and peripheral tissues. Analysis by quantitative RT-PCR. *J Mol Neurosci* 9: 93-102.
52. Sullivan AM, Toulouse A (2011) Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 22: 157-165.
53. Arenas E, Akerud P, Wong V, Boylan C, Persson H, et al. (1996) Effects of BDNF and NT-4/5 on striatonigral neuropeptides or nigral GABA neurons in vivo. *Eur J Neurosci* 8: 1707-1717.
54. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, et al. (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85: 1113-1124.
55. Shoulson I (1998) Where do we stand on neuroprotection? Where do we go from here? *Mov Disord* 13 Suppl 1: 46-48.
56. Reyes-Corona D, Escobedo L, Ayala-Davila J, Orozco-Barrios CE, Arango-Rodriguez ML, et al. Nt-polyplex-mediated neurturin delivery to dopaminergic neurons of hemiparkinsonian rats: A new approach in the repertoire of neurotrophic therapy. In: *Neuroscience Sf*, editor; 2009; Chicago, IL. Program No. 643.7/U4.
57. Georgievska B (2002) Aberrant Sprouting and Downregulation of Tyrosine Hydroxylase in Lesioned Nigrostriatal Dopamine Neurons Induced by Long-Lasting Overexpression of Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor in the Striatum by Lentiviral Gene Transfer. *Experimental Neurology* 177: 461-474.
58. Sajadi A, Bauer M, Thony B, Aebischer P (2005) Long-term glial cell line-derived neurotrophic factor overexpression in the intact nigrostriatal system in rats leads to a decrease of dopamine and increase of tetrahydrobiopterin production. *J Neurochem* 93: 1482-1486.
59. Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
60. McAllister AK, Katz LC, Lo DC (1999) Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 22: 295-318.
61. Friedman WJ (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci* 20: 6340-6346.

62. Kalb R (2005) The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. *Trends Neurosci* 28: 5-11.
63. Chao C, Hergenhahn M, Kaeser MD, Wu Z, Saito S, et al. (2003) Cell type- and promoter-specific roles of Ser18 phosphorylation in regulating p53 responses. *J Biol Chem* 278: 41028-41033.
64. Davey F, Davies AM (1998) TrkB signalling inhibits p75-mediated apoptosis induced by nerve growth factor in embryonic proprioceptive neurons. *Curr Biol* 8: 915-918.
65. Croll SD, Suri C, Compton DL, Simmons MV, Yancopoulos GD, et al. (1999) Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuroscience* 93: 1491-1506.
66. Cunha C, Angelucci A, D'Antoni A, Dobrossy MD, Dunnett SB, et al. (2009) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments. *Neurobiol Dis* 33: 358-368.
67. Rosenblad C, Georgievska B, Kirik D (2003) Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. *Eur J Neurosci* 17: 260-270.
68. Cress DE (2008) The need for regulatable vectors for gene therapy for Parkinson's disease. *Exp Neurol* 209: 30-33.
69. Toniatti C, Bujard H, Cortese R, Ciliberto G (2004) Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems. *Gene Ther* 11: 649-657.
70. Chtarto A, Bockstael O, Tshibangu T, Dewitte O, Levivier M, et al. (2013) A next step in adeno-associated virus-mediated gene therapy for neurological diseases: regulation and targeting. *Br J Clin Pharmacol* 76: 217-232.
71. Goverdhan S, Puntel M, Xiong W, Zirger JM, Barcia C, et al. (2005) Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther* 12: 189-211.
72. Ausserlechner MJ, Obexer P, Deutschmann A, Geiger K, Kofler R (2006) A retroviral expression system based on tetracycline-regulated tricistronic transactivator/repressor vectors for functional analyses of antiproliferative and toxic genes. *Mol Cancer Ther* 5: 1927-1934.
73. Gossen M, Bujard H (1995) Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type: commentary. *Biotechniques* 19: 213-216; discussion 216-217.
74. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, et al. (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268: 1766-1769.

75. Gossen M, Bujard H (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5547-5551.
76. Berens C, Hillen W (2003) Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur J Biochem* 270: 3109-3121.
77. Zhou X, Symons J, Hoppes R, Krueger C, Berens C, et al. (2007) Improved single-chain transactivators of the Tet-On gene expression system. *BMC Biotechnol* 7: 6.
78. St-Onge L, Furth PA, Gruss P (1996) Temporal control of the Cre recombinase in transgenic mice by a tetracycline responsive promoter. *Nucleic Acids Res* 24: 3875-3877.
79. Corbel SY, Rossi FM (2002) Latest developments and in vivo use of the Tet system: ex vivo and in vivo delivery of tetracycline-regulated genes. *Curr Opin Biotechnol* 13: 448-452.
80. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, et al. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7963-7968.
81. Georgievska B, Jakobsson J, Persson E, Ericson C, Kirik D, et al. (2004) Regulated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor into rat striatum, using a tetracycline-dependent lentiviral vector. *Hum Gene Ther* 15: 934-944.
82. Manfredsson FP, Bloom DC, Mandel RJ (2012) Regulated protein expression for in vivo gene therapy for neurological disorders: progress, strategies, and issues. *Neurobiol Dis* 48: 212-221.
83. Vogel R, Amar L, Thi AD, Saillour P, Mallet J (2004) A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain. *Hum Gene Ther* 15: 157-165.
84. Kreiss P, Cameron B, Rangara R, Mailhe P, Aguerre-Charriol O, et al. (1999) Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res* 27: 3792-3798.
85. Wu Z, Yang H, Colosi P (2010) Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther* 18: 80-86.
86. Yaguchi M, Ohashi Y, Tsubota T, Sato A, Koyano KW, et al. (2013) Characterization of the properties of seven promoters in the motor cortex of rats and monkeys after lentiviral vector-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther Methods* 24: 333-344.
87. Manfredsson FP, Burger C, Rising AC, Zuobi-Hasona K, Sullivan LF, et al. (2009) Tight Long-term dynamic doxycycline responsive nigrostriatal GDNF using a single rAAV vector. *Mol Ther* 17: 1857-1867.

88. Bannon MJ, Michelhaugh SK, Wang J, Sacchetti P (2001) The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 449-455.
89. Sacchetti P, Brownschidle LA, Granneman JG, Bannon MJ (1999) Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Brain Res Mol Brain Res* 74: 167-174.
90. Cusack B, McCormick DJ, Pang YP, Souder T, Garcia R, et al. (1995) Pharmacological and biochemical profiles of unique neurotensin 8-13 analogs exhibiting species selectivity, stereoselectivity, and superagonism. *J Biol Chem* 270: 18359-18366.
91. Decressac M, Volakakis N, Bjorklund A, Perlmann T (2013) NURR1 in Parkinson disease--from pathogenesis to therapeutic potential. *Nat Rev Neurol* 9: 629-636.
92. Sacchetti P, Carpentier R, Segard P, Olive-Cren C, Lefebvre P (2006) Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res* 34: 5515-5527.
93. Sacchetti P, Mitchell TR, Granneman JG, Bannon MJ (2001) Nurr1 enhances transcription of the human dopamine transporter gene through a novel mechanism. *J Neurochem* 76: 1565-1572.
94. Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, Gage FH (1999) Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development* 126: 4017-4026.
95. Michelhaugh SK, Vaitkevicius H, Wang J, Bouhamdan M, Krieg AR, et al. (2005) Dopamine neurons express multiple isoforms of the nuclear receptor nurr1 with diminished transcriptional activity. *J Neurochem* 95: 1342-1350.
96. Ramsden DB, Parsons RB, Ho SL, Waring RH (2001) The aetiology of idiopathic Parkinson's disease. *Mol Pathol* 54: 369-380.
97. Jankovic J, Chen S, Le WD (2005) The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 77: 128-138.
98. Bannon MJ, Whitty CJ (1997) Age-related and regional differences in dopamine transporter mRNA expression in human midbrain. *Neurology* 48: 969-977.
99. Chu Y, Kompoliti K, Cochran EJ, Mufson EJ, Kordower JH (2002) Age-related decreases in Nurr1 immunoreactivity in the human substantia nigra. *J Comp Neurol* 450: 203-214.
100. Heng X, Jin G, Zhang X, Yang D, Zhu M, et al. (2012) Nurr1 regulates Top IIbeta and functions in axon genesis of mesencephalic dopaminergic neurons. *Mol Neurodegener* 7: 4.

101. Nadella R, Voutilainen MH, Saarma M, Gonzalez-Barrios JA, Leon-Chavez BA, et al. (2014) Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. *J Neuroinflammation* 11: 209.
102. Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, et al. (1991) BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 350: 230-232.
103. Spina MB, Squinto SP, Miller J, Lindsay RM, Hyman C (1992) Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *J Neurochem* 59: 99-106.
104. Shults CW, Ray J, Tsuboi K, Gage FH (2000) Fibroblast growth factor-2-producing fibroblasts protect the nigrostriatal dopaminergic system from 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 883: 192-204.
105. Bjorklund A, Kirik D, Rosenblad C, Georgievska B, Lundberg C, et al. (2000) Towards a neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease: use of adenovirus, AAV and lentivirus vectors for gene transfer of GDNF to the nigrostriatal system in the rat Parkinson model. *Brain Res* 886: 82-98.
106. Huang R, Han L, Li J, Ren F, Ke W, et al. (2009) Neuroprotection in a 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson model using lactoferrin-modified nanoparticles. *J Gene Med* 11: 754-763.
107. Huang R, Ma H, Guo Y, Liu S, Kuang Y, et al. (2013) Angiopep-conjugated nanoparticles for targeted long-term gene therapy of Parkinson's disease. *Pharm Res* 30: 2549-2559.
108. Georgievska B, Kirik D, Bjorklund A (2004) Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor using a lentiviral vector induces time- and dose-dependent downregulation of tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. *J Neurosci* 24: 6437-6445.
109. Xiang QF, Zhang DM, Wang JN, Zhang HW, Zheng ZY, et al. (2015) Cabozantinib reverses multidrug resistance of human hepatoma HepG2/adr cells by modulating the function of P-glycoprotein. *Liver Int* 35: 1010-1023.
110. Zhang Y, Chen Q (2000) Changes of matrilin forms during endochondral ossification. Molecular basis of oligomeric assembly. *J Biol Chem* 275: 32628-32634.
111. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402-408.
112. Bannon MJ (2005) The dopamine transporter: role in neurotoxicity and human disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 204: 355-360.

113. Wang J, Michelhaugh SK, Bannon MJ (2007) Valproate robustly increases Sp transcription factor-mediated expression of the dopamine transporter gene within dopamine cells. *Eur J Neurosci* 25: 1982-1986.
114. Cusack B, Stanton T, Richelson E (1991) Developmental regulation of neurotensin receptor expression and function in murine neuroblastoma clone N1E-115. *Eur J Pharmacol* 206: 339-342.
115. Toy-Miou-Leong M, Cortes CL, Beaudet A, Rostene W, Forgez P (2004) Receptor trafficking via the perinuclear recycling compartment accompanied by cell division is necessary for permanent neurotensin cell sensitization and leads to chronic mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 279: 12636-12646.
116. Oh-hashii K, Ito M, Tanaka T, Hirata Y, Kiuchi K (2009) Biosynthesis, processing, and secretion of glial cell line-derived neurotrophic factor in astroglial cells. *Mol Cell Biochem* 323: 1-7.
117. Tian X, Wang G, Xu Y, Wang P, Chen S, et al. (2009) An improved tet-on system for gene expression in neurons delivered by a single lentiviral vector. *Hum Gene Ther* 20: 113-123.
118. Szulc J, Wiznerowicz M, Sauvain MO, Trono D, Aebischer P (2006) A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods* 3: 109-116.
119. Koponen JK, Kankkonen H, Kannasto J, Wirth T, Hillen W, et al. (2003) Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo. *Gene Ther* 10: 459-466.
120. Michalon A, Koshibu K, Baumgartel K, Spirig DH, Mansuy IM (2005) Inducible and neuron-specific gene expression in the adult mouse brain with the rtTA2S-M2 system. *Genesis* 43: 205-212.
121. Cho Y, Son HJ, Kim EM, Choi JH, Kim ST, et al. (2009) Doxycycline is neuroprotective against nigral dopaminergic degeneration by a dual mechanism involving MMP-3. *Neurotox Res* 16: 361-371.
122. Sharma N, Nehru B (2015) Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. *Neurochem Int* 87: 92-105.
123. Malvern Instruments. Zeta Potential An Introduction in 30 Minutes. Technical note.
124. Scott CC, Vacca F, Gruenberg J (2014) Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol* 31: 2-10.
125. Strambio-De-Castillia C, Niepel M, Rout MP (2010) The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 490-501.

126. Galleguillos D, Fuentealba JA, Gomez LM, Saver M, Gomez A, et al. (2010) Nurr1 regulates RET expression in dopamine neurons of adult rat midbrain. *J Neurochem* 114: 1158-1167.
127. Barteau B, Chevre R, Letrou-Bonneval E, Labas R, Lambert O, et al. (2008) Physicochemical parameters of non-viral vectors that govern transfection efficiency. *Curr Gene Ther* 8: 313-323.
128. Ruan J, Liu N, Ouyang H, Yang S, Li K (2014) Spatiotemporal control of porcine p65RHD expression by advanced Tet-On system in PIEC cells helps regulate NFsmall ka, CyrillicB activity. *Mol Biol Rep* 41: 1753-1761.
129. Pons L, Battaglia-Hsu SF, Orozco-Barrios CE, Ortiou S, Chery C, et al. (2009) Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. *PLoS One* 4: e6325.
130. Hickey P, Stacy M (2013) AAV2-neurturin (CERE-120) for Parkinson's disease. *Expert Opin Biol Ther* 13: 137-145.
131. Huyn ST, Burton JB, Sato M, Carey M, Gambhir SS, et al. (2009) A potent, imaging adenoviral vector driven by the cancer-selective mucin-1 promoter that targets breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 15: 3126-3134.
132. Narita M, Bahar R, Hatano M, Kang MM, Tokuhisa T, et al. (2001) Tissue-specific expression of a suicide gene for selective killing of neuroblastoma cells using a promoter region of the NCX gene. *Cancer Gene Ther* 8: 997-1002.
133. Parr MJ, Manome Y, Tanaka T, Wen P, Kufe DW, et al. (1997) Tumor-selective transgene expression in vivo mediated by an E2F-responsive adenoviral vector. *Nat Med* 3: 1145-1149.

Apéndice A

Lipofectamina 2000 utilizada como sistema de transfección para evaluar la funcionalidad de los nuevos plásmidos clonados

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de los nuevos plásmidos clonados y obtener resultados a corto plazo y a bajo costo, se procedió la transfectarlos con Lipofectamina 2000, siguiendo las recomendaciones del fabricante, en células N1E-115-Nurr1.

En la Tabla suplementaria 1, se muestran las concentraciones de cada plásmido evaluado. Los liposomas se formaron utilizando 2 μ L de lipofectamina, en pozos de cultivo de 2 cm², conteniendo la cantidad de cada plásmido, solo o en combinación (sistema regulable dual).

Tabla suplementaria 1. Cantidades de los plásmidos utilizados para formar el sistema regulable original dual o dependiente de Nurr1, transfectados con lipofectamina en células N1E-115-Nurr1.

Plásmidos del sistema original Tet-On Av			Plásmidos TRE-Tight		
1	pTet-On-Av	546 ng	+	pTRE-Tight-EGFP o pTRE-Tigh-hGDNF	254 ng
2	pNBRE3x-Tet-On-Av	542 ng	+	pTRE-Tight-EGFP o pTRE-Tight-hGDNF	258 ng
Plásmidos Control					
3	pNBRE3x-EGFP	800 ng			
4	pNBRE3x-hGDNF	800 ng			
Plásmidos bifuncionales del sistema Tet-On Av					
5	pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP	800 ng			
6	pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF	800 ng			

Apéndice B

Evaluación de la actividad del promotor NBRE3x en células N1E-115- Nurr1

Para determinar la actividad del promotor NBRE3x *in vitro*, se procedió a transfectar los plásmidos, pNBRE3x-EGFP y pNBRE3x-hGDNF, en células N1E-115-Nurr1 mediante Lipofectamina 2000, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los liposomas preparados con el plásmido pNBRE3x-EGFP o pNBRE3x-hGDNF (ver Tabla suplementaria 1) se incubaron con células N1E-115-Nurr1 para demostrar que el promotor NBRE3x depende de Nurr1. No se observó expresión basal en las células N1E-115-Nurr1 48 h después de la transfección (Figura suplementaria 1 A y B). En contraste, la presencia de GFP se observó en el $22 \pm 1\%$ ($n = 3$) de las células N1E-115-Nurr1 48 h post-transfección de pNBRE3x-EGFP (Figura suplementaria 1A). La presencia de la inmunorreactividad a hGDNF se observó en el $11 \pm 2\%$ ($n = 3$) de las células transfectadas con el pNBRE3x-hGDNF (Figura suplementaria 1B).

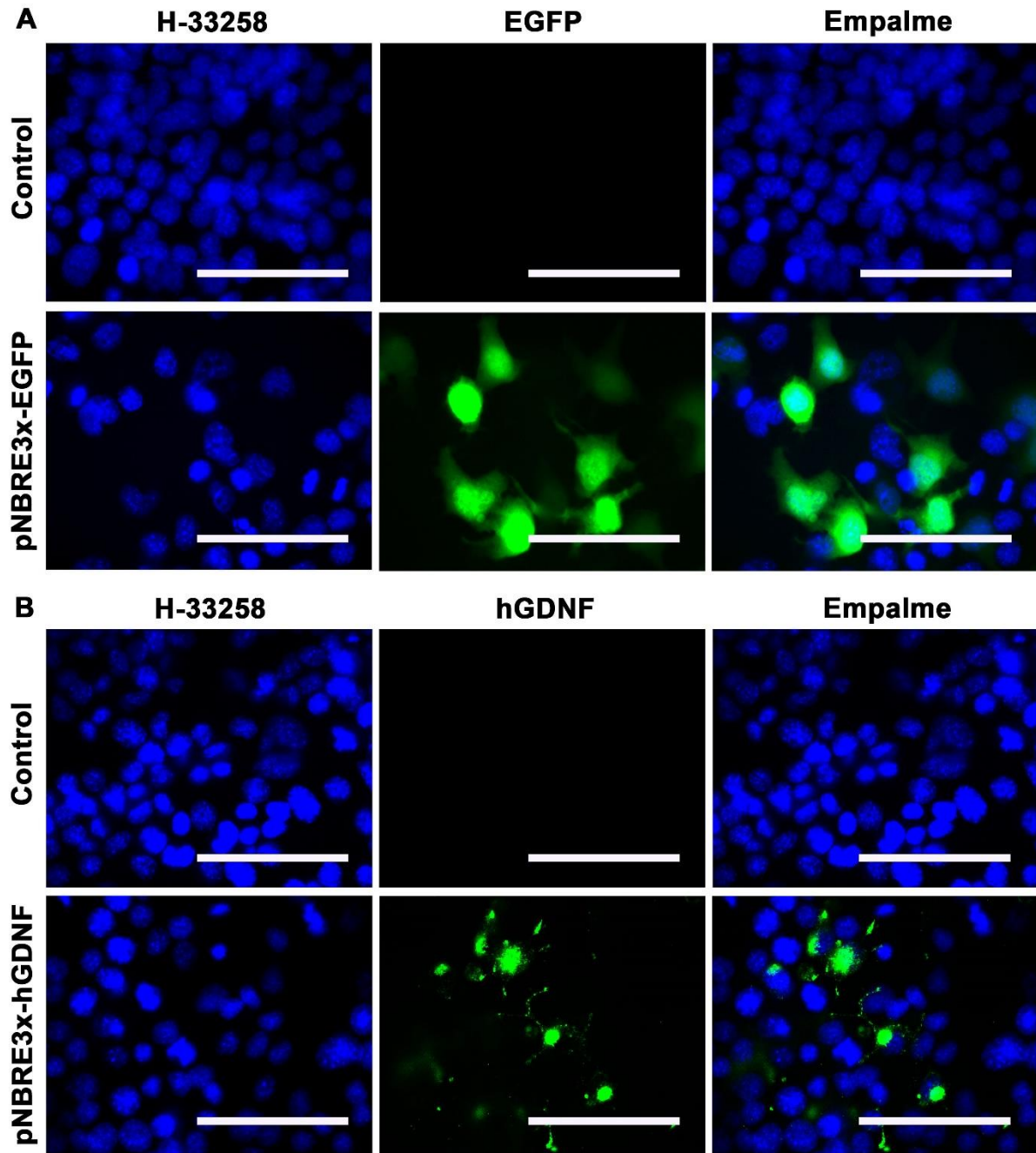


Figura Suplementaria 1. Actividad del promotor NBRE3x en células N1E-115-Nurr1 transfectadas con Lipofectamina 2000. A) Micrografías representativas que muestran la expresión de GFP después de la transfección del plásmido pNBRE3x-EGFP. B) Micrografías representativas que muestran la expresión de hGDNF, después de la transfección del plásmido pNBRE3x-hGDNF, revelada por IF indirecta contra hGDNF. Células N1E-115 transfectadas con el plásmido correspondiente (Control). Los núcleos fueron teñidos con Hoescht 33258 (H-33258). Barra de calibración = 100 μ m.

Apéndice C

Especificidad del promotor NBRE3x en células N1E-115-Nurr1

Con el objetivo de evaluar la especificidad del promotor NBRE3x, se procedió a transfectar el plásmido pNBRE3x-EGFP en células N1E-115-Nurr1, utilizando Lipofectamina 2000. En la Figura suplementaria 2, se muestra el resultado del ensayo de IF indirecta contra Nurr1, en donde se puede observar la expresión de GFP que colocaliza con la expresión de Nurr1. Nótese que únicamente las células que expresan GFP expresan Nurr1. Este resultado indica que el promotor NBRE3x es activo únicamente en presencia de Nurr1.

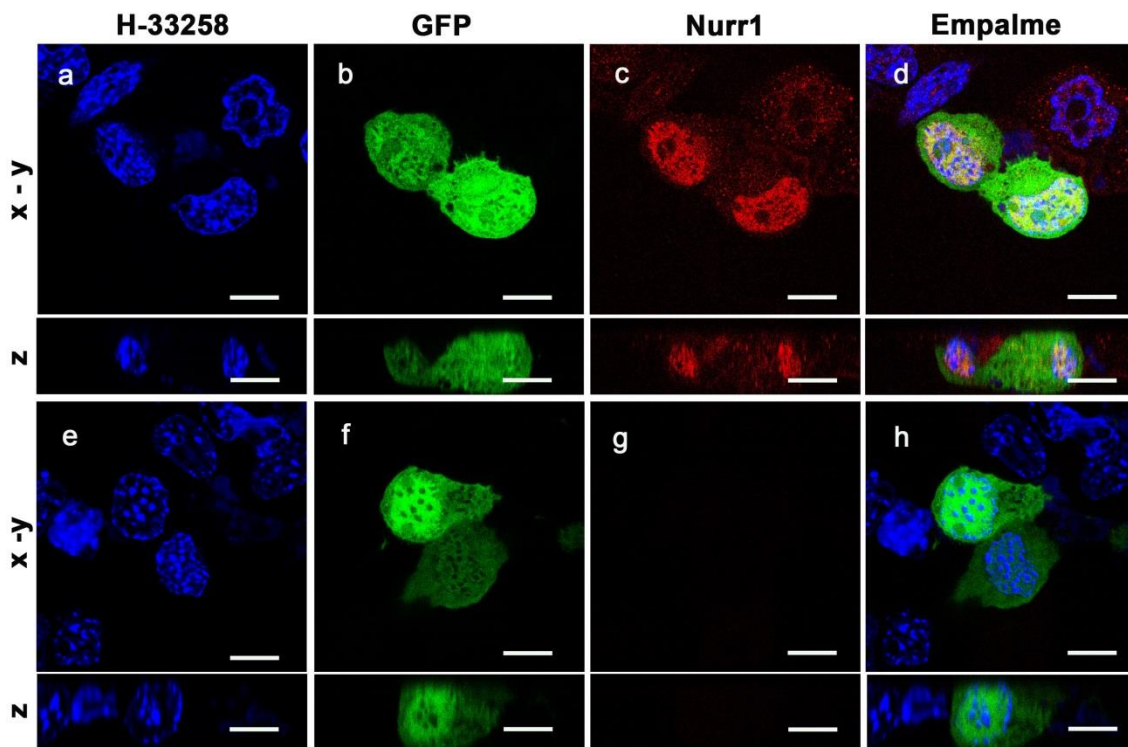


Figura suplementaria 2. El promotor NBRE3x es activo en células que expresan Nurr1. Se utilizó Lipofectamina 2000 para transfectar el pNBRE3x-EGFP en células N1E-115-Nurr1. Micrográficas representativas de la inmunorreactividad a Nurr1, fluorescencia nativa de GFP y contratinción nuclear con Hoechst-33258 (H-33258), en el plano x-y (horizontal) y z (vertical). (a-d). Se muestra la ausencia de expresión de Nurr1 en ausencia de anti-Nurr1, grupo control negativo (e-h). Barra de calibración = 10 µm.

Apéndice D

Actividad del sistema regulable dual Tet-On Avanzado original, modificado (NBRE3x) y bifuncional evaluado con GFP en células N1E-115-Nurr1, mediante lipofectamina

Para determinar la actividad del sistema Tet-On Avanzado, procedimos a transfectar el par plásmidos correspondientes al sistema original, modificado (que contiene el promotor NBRE3x) y bifuncional pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP, en presencia o ausencia de Dox. Se utilizó Lipofectamina 2000 como sistema de transfección, siguiendo las recomendaciones del fabricante, ver tabla suplementaria 1. Con lipofectamina 2000 se pudo co-transfectar dos plásmidos diferentes en células N1E-115-Nurr1, pTet-On-Av + pTRE-Tight-EGFP, (Figura suplementaria 3A), así como el par de plásmidos pNBRE3x-Tet-On-Av + pTRE-Tight-EGFP, (Figura suplementaria 3B) que corresponde al sistema regulable dual original y modificado. El conteo manual reveló que la proporción de células que expresaron GFP fué aproximadamente el 80% y 4 % respectivamente. El plásmido bifuncional pNBRE3x-Tet-On-Av-EGFP, también se transfectó de manera eficiente en donde se observó que la proporción de células que expresaron GFP fué aproximadamente el 90% (Figura suplementaria 3 C).

Después de la transfección, se administró Dox a 100 ng/mL (Dox +), cada día durante dos días. En todos los casos la expresión transgénica estuvo condicionada a la administración de Dox, y no se observó expresión transgénica basal en ausencia de Dox (Dox -). Con estos resultados se pudo concluir que el sistema regulable bifuncional (pNBRE3x-Tet-On-Av-EGFP) es más eficiente que el sistema regulable original (sistema dual: pTet-On-Av + pTRE-Tight-EGFP). Debido a que el sistema regulable bifuncional pNBRE3x-Tet-On-Av-EGFP supero al sistema regulable dual, se procedió a clonar al sistema regulable bifuncional para hGDNF (pNBRE3x-Tet-On-Av-hGDNF), para ser evaluado con las NPs de NTS-poliplex *in vitro e in vivo*.

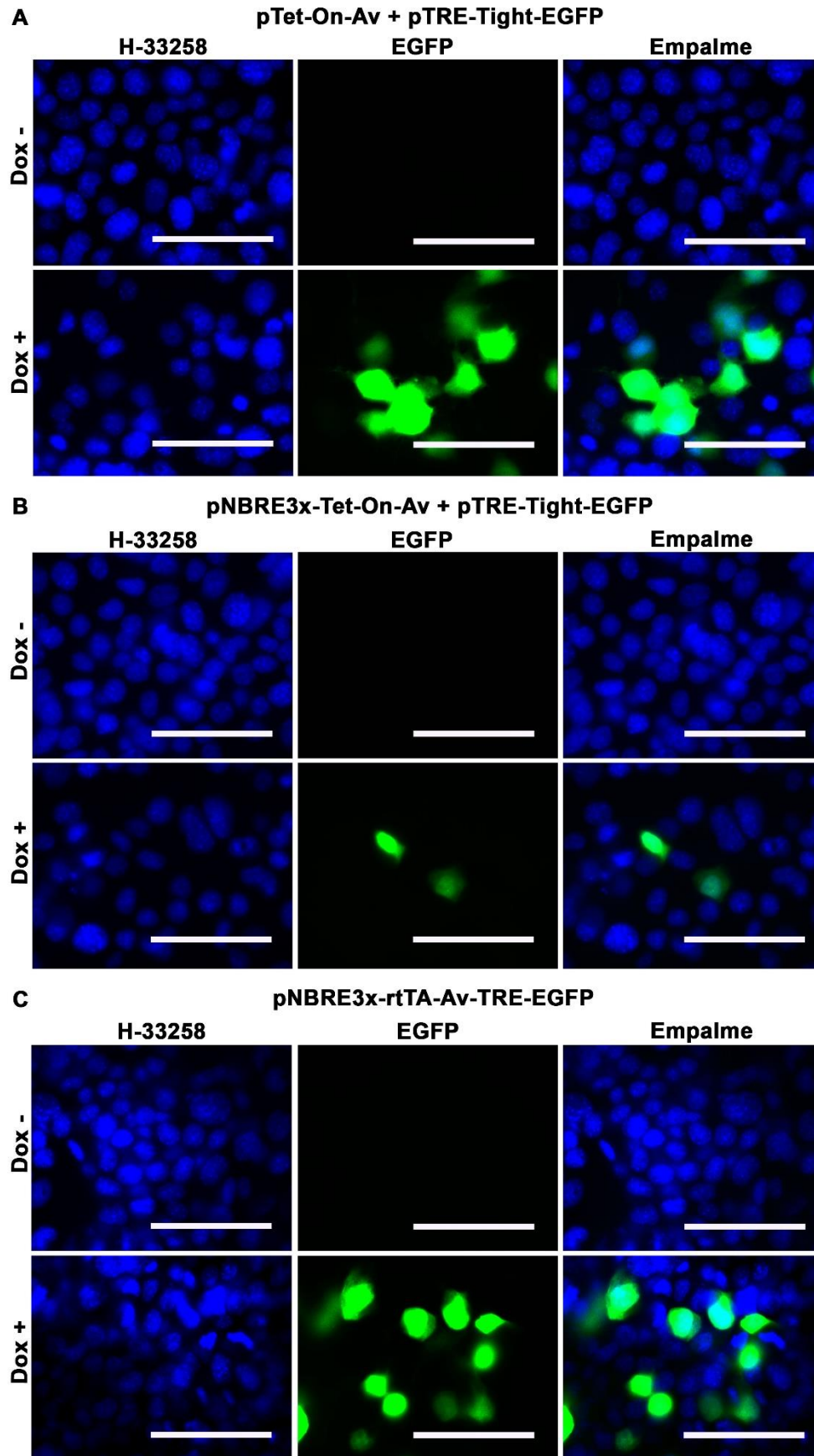


Figura Suplementaria 3. Inducción de la expresión de GFP por la administración de Dox (100 ng/mL) en células N1E-115-Nurr1. Se utilizó Lipofectamina 2000 para transfectar los plásmidos del sistema regulable que codifica para el transgén GFP. **(A)** La adición de Dox indujo la expresión del GFP (Dox +) en células transfectadas con el plásmido pTet-On-Av en combinación con el plásmido pTRE-Tight-GFP. Expresión del GFP en ausencia de Dox (Dox -). **(B)** La adición de Dox indujo la expresión de GFP (Dox +) en células transfectadas con el plásmido pNBRE3x-Tet-On-Av en combinación con el plásmido pTRE-Tight-EGFP. Expresión de GFP en ausencia de Dox (Dox -). **(C)** La adición de Dox indujo la expresión de GFP (Dox +) en células transfectadas con el plásmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-EGFP. Expresión de GFP en ausencia de Dox (Dox -). Barra de calibración = 100 μ m.

Apéndice E

Actividad del sistema regulable Tet-On Avanzado original y bifuncional hGDNF en células N1E-115-Nurr1, mediante Lipofectamina 2000.

Después de clonar la plasmido bifuncional pNBRE3x-Tet-On-Av-hGDNF, se procedió a evaluar su actividad, en presencia o ausencia de Dox. Se utilizó el sistema regulable dual como control positivo de la inducción de la expresión de hGDNF. Usando lipofectamina 2000 se pudo co-transfectar dos plásmidos diferentes en células N1E-115-Nurr1 (Tabla suplementaria 1), pTet-On-Av + pTRE-Tight- hGDNF, (Figura suplementaria 4A), que corresponde al sistema regulable dual original. El conteo manual reveló que el 50% de células expresaron hGDNF. El plásmido bifuncional pNBRE3x-Tet-On-Av-hGDNF también se transfectó de manera eficiente en donde se observó que la proporción de células que expresan la hGDNF fué aproximadamente el 60% (Figura suplementaria 4 B).

Después de la transfección, se administró Dox a 100 ng/mL (Dox +), cada día durante dos días. En todos los casos la expresión transgénica estuvo condicionada a la administración de Dox, y no se observó expresión transgénica basal en ausencia de Dox (Dox -). Como se esperaba, el sistema regulable bifuncional fue más eficiente que el sistema regulable dual, apoyando el uso del sistema regulable bifuncional pNBRE3x-Tet-On-Av-hGDNF para ser evaluado con las NPs de NTS-poliplex *in vitro e in vivo*.

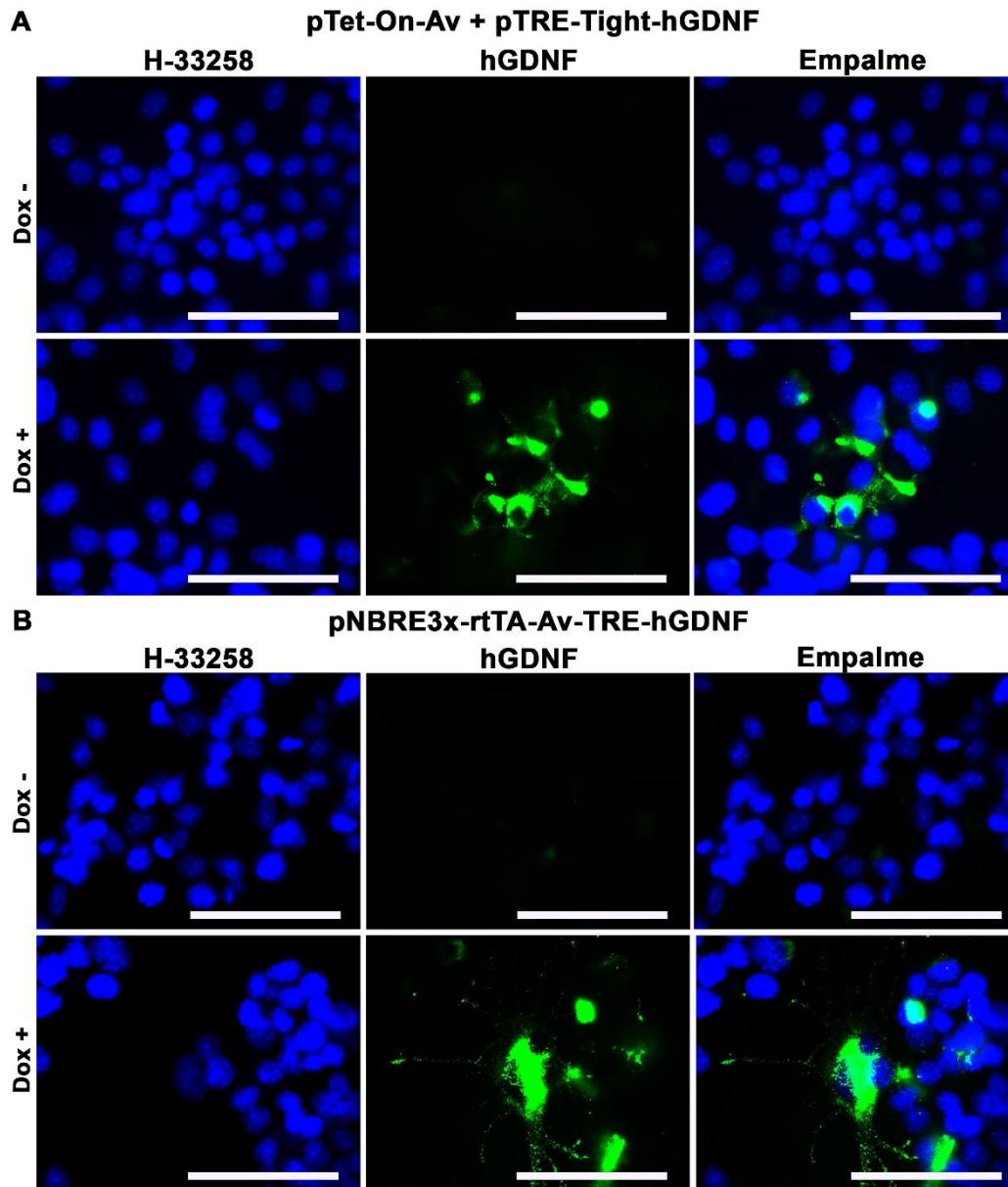


Figura suplementaria 4. Inducción de la expresión de hGDNF por la administración de Dox (100 ng/mL) en células N1E-115-Nurr1. Se utilizó Lipofectamina 2000 para transfectar los plásmidos del sistema regulable con el transgén hGDNF. **(A)** La adición de Dox indujo la expresión del hGDNF (Dox +) en células transfectadas con el plásmido pTet-On-Av en combinación con el plásmido pTRE-Tight-hGDNF. La expresión de hGDNF fue revelada por IF indirecta contra hGDNF. Expresión de hGDNF en ausencia de Dox (Dox -). **(B)** La adición de Dox indujo la expresión de hGDNF (Dox +) en células transfectadas con el plásmido pNBRE3x-rtTA-Av-TRE-hGDNF. Expresión de hGDNF en ausencia de Dox (Dox -). Los núcleos se tiñeron con Hoescht 33258 (H-33258). Barra de calibración = 100 μ m.